

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA MARIA
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
DEPARTAMENTO DE ANÁLISES CLÍNICAS E TOXICOLÓGICAS**

Marcos Vinícius Missel

**ATIVIDADES ANTIBACTERIANA E ANTIBIOFILME DO EXTRATO BRUTO
DE *Datura suaveolens***

**ORIENTADOR: ROBERTO CHRIST VIANNA SANTOS
CO-ORIENTADORA: KAREN FREITAS SANTOS**

**Santa Maria, RS
2019**

Marcos Vinícius Missel

**ATIVIDADES ANTIBACTERIANA E ANTIBIOFILME DO EXTRATO BRUTO
DE *Datura suaveolens***

Dissertação apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM, RS), como requisito parcial para a obtenção do título de **Mestre em Ciências Farmacêuticas**.

Orientador: Prof. Dr. Roberto Christ Vianna Santos
Co-orientadora: Prof^a Dr^a Karen Freitas Santos

Santa Maria, RS

2019

Marcos Vinícius Missel

**ATIVIDADES ANTIBACTERIANA E ANTIBIOFILME DO EXTRATO BRUTO
DE *Datura suaveolens***

Dissertação apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM, RS), como requisito parcial para a obtenção do título de **Mestre em Ciências Farmacêuticas**.

Aprovado em 15 de julho de 2019:

Roberto Christ Vianna Santos, Dr. (UFSM)
(Presidente/Orientador)

Karen Freitas Santos, Dra. (URI – FW)
(Presidente/Co-orientadora)

Pauline Cordenonsi Bonez, Dra. (URI – Santiago)

Paulo Edelvar Corrêa Peres, Dr. (UFSM)

Santa Maria, RS
2019

AGRADECIMENTOS

A concretização deste trabalho ocorreu, principalmente, pelo auxílio, compreensão e dedicação de várias pessoas. Agradeço imensamente a todos que de alguma forma, contribuíram de forma direta ou indireta para a conclusão deste estudo, e de uma maneira especial, agradeço:

- à minha co-orientadora professora Karen Freitas Santos que despertou e impulsionou esta jornada acadêmica com seu conhecimento e amor pela Microbiologia;

- ao meu orientador, professor Roberto C. V. Santos, pela oportunidade concedida, pela confiança em mim depositada e pela pessoa humana, incentivadora e por compreender minhas singularidades;

- à minha irmã Cascineli e minha mãe Fátima Missel, que sempre acreditaram em mim e incentivaram todas as minhas ações. Obrigado por compreenderem as minhas faltas, foi por vocês que não desisti...

- à minha querida amiga Francini Schorek que prontamente se dispôs a me ajudar nos primórdios deste estudo. Obrigado pela tua amizade e por tudo o que confidenciamos um ao outro. Com certeza, teu apoio e compreensão foram fundamentais para que eu seguisse em frente!

- aos meus queridos amigos Ana Patrícia Zanini, Roberto do Carmo e Vinícius Chimainski, que tão gentilmente me receberam e fizeram a minha chegada mais especial. Obrigado por tudo o que compartilhamos e pelo apoio;

- ao grupo LAPEMICRO agradeço pela convivência diária e por tudo o que construímos. Espero reencontra-los muito em breve;

- à Camilla Filippi e Camila Casagrande muito obrigado pela amizade, por me transmitirem tranquilidade e por serem pessoas disponíveis. Certamente a jornada foi mais amena porque pude contar com vocês. Obrigado pelo suporte e por serem empáticas;

- ao meu namorado Willian que, com seu olhar afável, incentivou e colaborou com o desenvolvimento deste estudo em tudo o que lhe fosse possível, deixando este trabalho e a minha vida mais colorida. Seguramente,

todo o processo foi mais leve porque tu estavas ao meu lado. À ti todo o meu carinho, respeito e admiração;

- à equipe de professores e funcionários do Programa de Pós Graduação em Ciências Farmacêuticas pela oportunidade de desenvolver e concretizar este trabalho;

- aos professores, membros da banca, pela disposição e por avaliarem este trabalho;

- à Universidade Federal de Santa Maria pelo ensino público, gratuito e de qualidade;

- à CAPES e ao CNPq pela bolsa de estudos e pelos recursos financeiros concedidos;

Enfim, a todos aqueles que, de alguma forma, contribuíram para a realização deste estudo, e não estão nominalmente citados. Muito obrigado!

“...Não é sobre ganhar, é sobre não desistir. Se você tem um sonho, lute por ele. Existe uma disciplina. Não é sobre quantas vezes você foi rejeitado, caiu e teve que levantar. É sobre quantas vezes você fica empé, levanta a cabeça e segue em frente”

Lady Gaga

RESUMO

ATIVIDADES ANTIBACTERIANA E ANTIBIOFILME DO EXTRATO BRUTO DE *Datura suaveolens*

AUTOR: MARCOS VINÍCIUS MISSEL
ORIENTADOR: ROBERTO CHRIST VIANNA SANTOS
CO-ORIENTADORA: KAREN FREITAS SANTOS

O controle de microrganismos infecciosos às vezes é ineficaz mesmo com o desenvolvimento de fármacos antibacterianos inovadores. Por conseguinte, os patógenos estão se mostrando resistentes à maioria dos medicamentos conhecidos impactando na morte prematura de aproximadamente 300 milhões de pessoas, entre infecções hospitalares e ambientais, com uma perda de US\$ 100 trilhões para a economia global, até 2050. Com base nestes dados a Organização Mundial da Saúde (OMS) nomeou a resistência aos antimicrobianos como uma das três ameaças mais importantes à saúde pública do século XXI. Este fato traz um olhar para a habilidade que os microrganismos possuem de viver em comunidades chamadas de biofilmes, desenvolvendo seu metabolismo ligado a uma superfície, deste modo, tal problemática incentiva a procura por alternativas que contornem o problema da resistência bacteriana e volta o olhar para os produtos naturais, onde diversos extratos de plantas medicinais tem apresentado efeitos antibacterianos que podem representar uma alternativa terapêutica promissora. Como é o caso das plantas medicinais da família Solanaceae, que possuem alcaloides como compostos majoritários, os quais são conhecidos como potentes agentes antimicrobianos. Desse modo, o presente trabalho teve por objetivo verificar se o extrato bruto de *Datura suaveolens* (popularmente conhecida como trombeteiro, saia-branca ou sopro-do-diabo) é capaz de inibir o crescimento de microrganismos em sua forma planctônica e na forma de biofilmes, além de quantificar biofilme de isolados clínicos de *Klebsiella pneumoniae*. Os testes de suscetibilidade foram realizados pelos métodos de disco-difusão e microdiluição em caldo. Para a determinação da Concentração de inibição e de destruição do Biofilme o extrato bruto foi testado na Concentração Inibitória Mínima (CIM) e em concentrações subinibitórias. Os resultados demonstraram que o extrato bruto de *D. suaveolens* possui discreta atividade antibacteriana para microrganismos na forma planctônica, entre isolados clínicos e cepas padrões, com concentrações entre 10 e 1,5 mg/mL. Os isolados clínicos de *K. pneumoniae* foram classificados como forte formadores de biofilme. O extrato bruto de *D. suaveolens* foi capaz de inibir, discretamente, o biofilme de *Pseudomonas aeruginosa* (PA01) e de um isolado clínico de *K. pneumoniae*, em concentrações subinibitórias de 0,625 mg/mL e 1,25 mg/mL, respectivamente, entretanto não foi capaz de destruir o biofilme formado de ambas as cepas, revelando que o material vegetal em questão atua nas fases iniciais da formação do biofilme.

Palavras-chave: Plantas Medicinais. Multidroga Resistente. Metabólitos Secundários. Concentração Inibitória Mínima.

ABSTRACT

ANTIBACTERIAL AND ANTIBIOFILME ACTIVITIES OF THE GROSS EXTRACT OF *Datura suaveolens*

AUTHOR: MARCOS VINÍCIUS MISSEL
ADVISOR: ROBERTO CHRIST VIANNA SANTOS
CO-ADVISOR: KAREN FREITAS SANTOS

Control of infectious microorganisms is sometimes ineffective even with the development of innovative antibacterial drugs. As a result, pathogens are proving resistant to most known drugs impacting the premature death of approximately 300 million people, including hospital and environmental infections, with a \$ 100 trillion loss to the global economy by 2050. Based on these The World Health Organization (WHO) has named antimicrobial resistance as one of the three most important public health threats of the 21st century. This fact brings a look at the ability of microorganisms to live in communities called biofilms, developing their metabolism linked to a surface, thus, such a problem encourages the search for alternatives that bypass the problem of bacterial resistance and looks back to natural products, where various extracts of medicinal plants have shown antibacterial effects that may represent a promising therapeutic alternative. As is the case with medicinal plants of the Solanaceae family, which have alkaloids as major compounds, which are known as potent antimicrobial agents. Thus, the present work aimed to verify if *Datura suaveolens* crude extract (popularly known as trumpeter, white skirt or devil's breath) is capable of inhibiting the growth of microorganisms in their planktonic form and in the form of biofilms. , besides quantifying biofilm of clinical isolates of *Klebsiella pneumoniae*. Susceptibility tests were performed by broth disc diffusion and microdilution methods. In order to determine the inhibition and destruction concentration of the biofilm the crude extract was tested at minimum inhibitory concentration (MIC) and subinhibitory concentrations. The results showed that *D. suaveolens* crude extract has discrete antibacterial activity for planktonic microorganisms, between clinical isolates and standard strains, with concentrations between 10 and 1.5 mg/mL. Clinical isolates of *K. pneumoniae* were classified as strong biofilm formers. *D. suaveolens* crude extract was able to discreetly inhibit the biofilm of *Pseudomonas aeruginosa* (PA01) and a clinical isolate of *K. pneumoniae* at subinhibitory concentrations of 0.625 mg/mL and 1.25 mg/mL, respectively. however, it was unable to destroy the biofilm formed from both strains, revealing that the plant material in question acts in the early stages of biofilm formation.

Keywords: Medicinal plants. Resistant Multidrug. Secondary Metabolites. Minimal Inhibitory Concentration.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Representação esquemática dos principais mecanismos de resistência microbianos	15
Figura 2: Estágios do desenvolvimento dos biofilmes, em caráter heterogêneo	17
Figura 3: Graus de metabolismo bacteriano no interior do biofilme	18
Figura 4: Rota biosintética dos alcaloides	23
Figura 5: Modelo conformacional do esqueleto tropânico	23
Figura 6: Partes aéreas de <i>Datura suaveolens</i>	26
Figura 7: Fórmula estrutural da escopolamina como sal de amônio quaternário	27
Figura 8: Destruição do biofilme de PA01	37
Figura 9: Inibição da formação de biofilme em PA01	38
Figura 10: Destruição de biofilme em isolado clínico de <i>K. pneumoniae</i>	39
Figura 11: Inibição da formação de biofilme de <i>K. pneumoniae</i>	41

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Estirpes bacterianas envolvidas na infecção associada ao biofilme em superfícies aderentes	20
Tabela 2: Ações dos principais metabólitos secundários	21
Tabela 3: Microrganismos utilizados	29
Tabela 4: Resultados do ensaio de disco-difusão	34
Tabela 5: Resultados para a determinação da Concentração Inibitória e Bactericida Mínimas	35
Tabela 6: Quantificação de biofilme em isolados clínicos de <i>K. pneumoniae</i> ..	38

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	12
2 OBJETIVOS	14
2.1 OBJETIVO GERAL	14
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	14
3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	15
3.1 RESISTÊNCIA AOS ANTIMICROBIANOS	15
3.2 BIOFILME.....	17
3.3 PLANTAS MEDICINAIS	20
3.4 ALCALOIDES.....	22
3.5 GÊNERO <i>Datura</i> spp.	25
3.6 <i>Datura suaveolens</i>	26
4 MATERIAIS E MÉTODOS	28
4.1 MATERIAL VEGETAL.....	28
4.2 PROCEDIMENTO DE EXTRAÇÃO	28
4.3 ESTIRPES BACTERIANAS	28
4.4 MEIOS DE CULTIVO E INÓCULO BACTERIANO	30
4.5 TESTE DE DISCO-DIFUSÃO	30
4.6 DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO INIBITÓRIA MÍNIMA (CIM)	31
4.7 QUANTIFICAÇÃO DE BIOFILME	31
4.8 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIBIOFILME	32
4.8.1 Inibição do biofilme	33
4.8.2 Destruição do biofilme	33
4.9 ANÁLISE ESTATÍSTICA	33
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO	34
6 CONCLUSÃO	43
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	45

1 INTRODUÇÃO

Após 70 anos de uso desenfreado de antimicrobianos as bactérias desenvolveram e disseminaram mecanismos de resistência aos fármacos comprometendo o arsenal terapêutico disponível para o tratamento das infecções atuais. De acordo com a OMS, as infecções causadas por estirpes multidroga resistente (MDR) excede 25 mil mortes por ano, elevando dados de morbidade, mortalidade e o prolongamento das doenças (ALMAGOR et al., 2018; OMS, 2012).

As enfermidades causadas por bactérias MDR carregam um importante impacto econômico estimado em mais de US\$ 20 bilhões por ano, somente nos Estados Unidos da América. No Brasil estima-se que, em média, os gastos por dia com a permanência em Unidade de Terapia Intensiva cheguem a R\$ 1.257,00 a mais nos casos de infecção causada por bactérias resistentes (AGUIAR et al., 2002; KOHLENBERG et al., 2009; NANGINO et al., 2012).

De acordo com Moraes e colaboradores (2013) 80% das infecções bacterianas estão relacionadas com a adesão destes às superfícies. Os microrganismos se aderem por meio de interações eletrostáticas, e a sua capacidade de atrair outras células bacterianas ao sítio de infecção, revelando um mecanismo de resistência capaz de driblar antimicrobianos e o sistema imunológico.

A esta comunidade de microrganismos aderidos, dá-se o nome de biofilmes. O biofilme é formado por uma matriz extracelular constituída de DNA, proteínas e polissacarídeos, composto por comunidades bacterianas aderidas à superfícies bióticas ou não, podendo ser de natureza poli ou monomicrobiano. Este mecanismo bacteriano se apresenta como um contribuinte potencial para a resistência, pois pode aumentar em aproximadamente mil vezes a patogenicidade em relação às bactérias em sua forma planctônica (YU et al., 2018; NASIRMOGHADAS et al., 2018).

A arquitetura protetora do biofilme permite a sobrevivência de bactérias em ambientes hostis, além de retardar a difusão de antimicrobianos dificultando a sua penetração e a eliminação dos patógenos imersos nessa matriz. Portanto, a aplicação de abordagens terapêuticas para o controle da formação e inibição do

biofilme, bem como para cepas na forma planctônica é altamente desejável (YU et al., 2018; KORUKLUOGLU; GULGOR, 2016).

Neste contexto, o uso de plantas medicinais, para o tratamento e profilaxia de doenças, é uma estratégia milenar e amplamente utilizada por praticamente toda a população mundial. Esta prática contribui significativamente para divulgar as potencialidades terapêuticas dos vegetais através da ação de substâncias naturais biologicamente ativas (GIANG; OTSUKA, 2018).

O papel dos produtos naturais no desenvolvimento de fármacos representam uma alternativa farmacologicamente promissora que contorna os problemas de resistência bacteriana, não só quando os compostos biologicamente ativos são utilizados como princípios ativos, mas também quando são usados como matéria-prima ou como modelo base para síntese de novos compostos (ANDRADE et al., 2018).

Neste sentido, *Datura suaveolens* é um espécime vegetal que pode representar uma alternativa terapêutica aos mecanismos de resistência bacteriana por apresentar alcaloides tropânicos como metabólitos majoritários, os quais são descritos como potenciais agentes antibacterianos (SIMÕES et al., 2010; GONÇALVES, 2007). No entanto, não se encontram relatos na literatura de ensaios referentes à avaliação do seu potencial antibiofilme. Em virtude da crescente resistência frente a fármacos já conhecidos, esta pesquisa surgiu da necessidade de buscar recursos e alternativas terapêuticas, que possam representar uma importante fonte de obtenção de fármacos antibacterianos que contornem os mecanismos de resistência bacteriana.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar, *in vitro*, a ação antibacteriana e antibiofilme do extrato bruto de *D. suaveolens*.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- ✓ Obter o extrato bruto hidroalcoólico das partes aéreas de *D. suaveolens*;
- ✓ Realizar triagem de suscetibilidade bacteriana com microrganismos de interesse clínico;
- ✓ Realizar teste de micro diluição em caldo, a partir do *screening* inicial, afim de determinar a concentração inibitória mínima do extrato bruto de *D. suaveolens*;
- ✓ Determinar a concentração bactericida e bacteriostática mínima;
- ✓ Quantificar a produção de biofilme em isolados clínicos de *Klebsiella pneumoniae*;
- ✓ Determinar o potencial de inibição e destruição de biofilme bacteriano com o extrato bruto de *D. suaveolens* em isolados clínicos de *Klebsiella pneumoniae* e *Pseudomonas aeruginosa* (PA01).

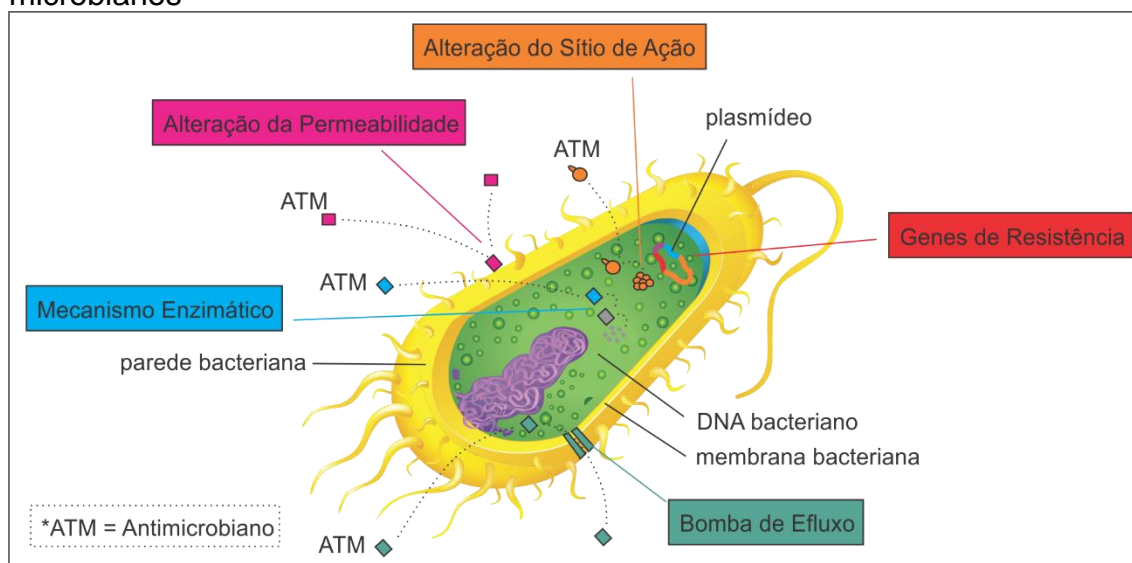
3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 RESISTÊNCIA AOS ANTIMICROBIANOS

Os antimicrobianos agem tipicamente por meio de cinco processos principais: (1) inibição da síntese da parede celular (penicilina, cefalosporinas, vancomicina); (2) ruptura da função da membrana celular (polimixinas tais como colistina); (3) inibição da síntese de proteínas (tetraciclina, estreptomicina, cloranfenicol); (4) inibição da síntese de ácidos nucleicos (rifamicina, quinolonas); e (5) ação como antimetabólitos (trimetoprim, sulfametoxazol) (EGOROV; ULYASHOVA; RUBTSOVA, 2018; JIJIE et al., 2017).

Os microrganismos podem apresentar resistência intrínseca aos mecanismos tradicionais, a qual é expressa naturalmente por determinada espécie, ou adquirida, por meio de mutação ou transmissão de genes. As principais maneiras, desenvolvidas pelas bactérias, para driblar o mecanismo de ação dos fármacos incluem: modificação do sítio de ação, impermeabilização da membrana plasmática por alteração na conformação dos canais de porina, capacidade de formar biofilme, alteração conformacional das proteínas de ligação da penicilina, bombas de efluxo e inativação enzimática do fármaco (Figura 1) (JIANG et al., 2019).

Figura 1: Representação esquemática dos principais mecanismos de resistência microbianos



Fonte: adaptado de (JANSEN; KNIRSCH; ANDERSON, 2018).

A descoberta, comercialização e a administração de fármacos antimicrobianos para tratar infecções revolucionaram a medicina moderna e trouxeram a convalescência de inúmeras enfermidades não tratáveis, alterando positivamente o paradigma terapêutico. Entretanto, a resistência aos antibióticos se desenvolve naturalmente como consequência da habilidade que as populações bacterianas têm de se adaptar ao uso indiscriminado de medicamentos, aumentando a pressão seletiva e tornando esse panorama inevitável e irreversível (SINGH et al., 2012; KULAC et al., 2013).

Vários fatores-chave promovem a resistência aos antimicrobianos. Além de mutações orientadas pela evolução do DNA bacteriano, a resistência também pode ser impulsionada por fatores ambientais e epidemiológicos como o uso destes fármacos em grande escala pela indústria avícola e pecuária, prescrição imprópria (indicação, dose e período de tempo incorretos), infecção hospitalar, compra ilegal e fatores culturais (ROMO; QUIRÓS, 2019).

De acordo com a Organização Mundial da saúde (OMS) a problemática da resistência aos antimicrobianos representa um problema de saúde pública mundial, comparado ao que se verificou na era pré-antibióticos visto que a pesquisa e o desenvolvimento (P&D) de novos fármacos não acompanham a evolução dos mecanismos de resistência (NICOLSI et al., 2015). Neste sentido, a OMS (2017a; 2017b) publicou uma lista com 12 famílias de bactérias que representam maior ameaça para a saúde humana com o intuito de promover a P&D de novos antibióticos. O grupo mais crítico inclui bactérias multidroga resistentes (MDR) como *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa* e gênero *Enterobacteriaceae*.

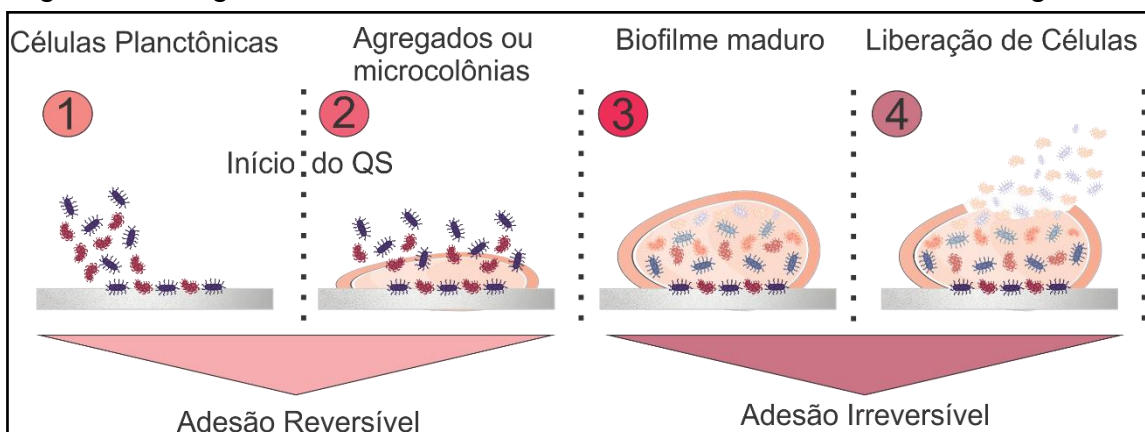
O estímulo à P&D não se baseia somente na cura das doenças causadas pelos microrganismos MDR, mas também tem por objetivo minimizar os custos com a internação de pacientes acometidos por infecções graves, uma vez que as enfermidades causadas por microrganismos MDR oneram um importante fardo econômico estimado em mais de 20 bilhões de dólares por ano, somente nos Estados Unidos da América. Além disso, estima-se que a resistência aos fármacos antimicrobianos possa causar cerca de 300 milhões de mortes prematuras até 2050, com uma perda de até US\$ 100 trilhões para a economia global (MUNITA; ARIAS, 2016; MATH, 2012).

3.2 BIOFILME

Os biofilmes representam um grave problema de saúde global devido a sua capacidade de tolerar antibióticos, sistemas de defesa do hospedeiro e outros processos externos. São comunidades microbianas imóveis que colonizam e se desenvolvem em superfícies bióticas ou abióticas, como suturas, cateteres e implantes dentários. São formados por substâncias poliméricas extracelulares auto-produzidas que são capazes de causar infecções que só podem ser tratadas pela sua remoção mecânica, tornando o tratamento inviável (COSTERTON; MONTANARO; ARCIOLA, 2005; JACKSON et al., 2002).

O biofilme bacteriano se caracteriza por uma complexa estrutura de proteínas, polissacarídeos e DNA em uma matriz polimérica extracelular encontrado, por exemplo, no sistema aquático natural, tecidos biológicos, dispositivos médicos, etc. Devido à proximidade das células, dentro da estrutura do biofilme, os microrganismos trocam material genético e moléculas sinalizadoras de *quorum sensing* (QS) apresentando um caráter heterogêneo, onde cada comunidade de biofilme modula sua arquitetura em resposta a estímulos no processo interno e externo (Figura 2) (BONEZ et al., 2013; KYIMACI et al., 2018; SHI et al., 2014).

Figura 2: Estágios do desenvolvimento dos biofilmes, em caráter heterogêneo



Fonte: adaptado de (MACEDO E ABRAHAM, 2009).

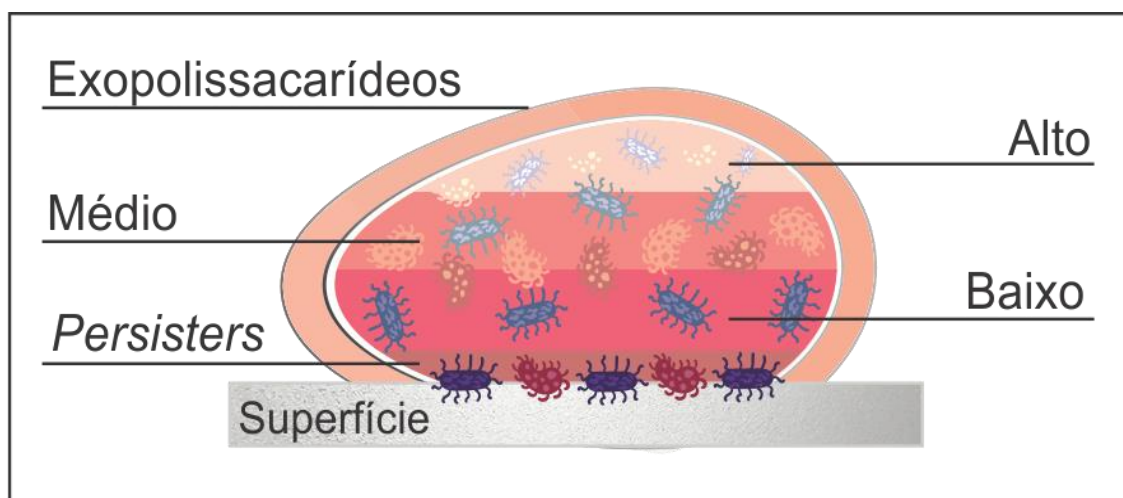
Microrganismos que vivem nessas comunidades são frequentemente mil vezes mais tolerantes aos antimicrobianos, alterações de pH, osmolaridade, escassez de nutrientes, forças mecânicas e de cisalhamento do que quando na

forma planctônica, revelando que alguns mecanismos envolvidos na resistência do biofilme diferem dos mecanismos da resistência em microrganismos em sua forma livre (SINGH et al., 2012; MADIGAN et al., 2016; FUX et al., 2005).

Alguns mecanismos que conferem a resistência multifatorial dentro do biofilme são, por exemplo, a presença de fímbrias, que favorece a adesão do biofilme à superfície; resistência mediada por enzimas, responsáveis por degradar metais pesados e compostos fenólicos e aromáticos; a heterogenicidade no metabolismo e taxa de crescimento, onde microrganismos com baixa atividade metabólica ou *persisters* não são atingidos pelos fármacos que conseguem adentrar o biofilme; QS, responsável por regular a densidade populacional através de sinalização química; bombas de efluxo e resposta ao estresse (KYIMACI et al., 2018; FAHED et al., 2017; DONG et al., 2015).

As células *persisters*, ou células persistentes, são resistentes ao efeito bactericida do antimicrobiano em doses elevadas por apresentarem uma baixa atividade metabólica no interior do biofilme (Figura 3). Essa classe celular não é considerada mutante, contudo existe a possibilidade de traduzirem uma variação fenotípica (HOFSTEENAGE; NIMWEGEN; SILANDER, 2013) caracterizado como transitório e não herdável, diferenciando-o do conceito de resistência, que é determinado por condições genéticas específicas (FAUVART; DE GROOTE; MICHIELS, 2011).

Figura 3: Graus de metabolismo bacteriano no interior do biofilme



Fonte: adaptado de (JAMAL et al., 2015)

O mecanismo de QS depende da síntese, libertação e incorporação de auto indutores (AIs) no meio circundante, cuja concentração está relacionada com a densidade de bactérias secretoras. Os AIs são moléculas de sinalização extracelular, que se acumulam no ambiente proporcionalmente à densidade celular, são utilizados para essa comunicação intercelular (DEEP; CHAUDHATY; GUPTA, 2011; KABIR et al., 2010; KRISHNAN; YIN; CHAN, 2012).

Sua função é regular a expressão gênica em outras células da comunidade, que, por sua vez, controla várias respostas bacterianas. Vários processos fisiológicos bacterianos, incluindo virulência, motilidade, luminescência, formação de biofilme, esporulação, desenvolvimento de competência genética, síntese de antibióticos peptídicos, produção de enzimas proteolíticas secretadas e fluorescência são regulados por QS (ASFOUR, 2018).

Aproximadamente 80% das infecções microbianas crônicas e recorrentes no corpo humano são devidas ao biofilme bacteriano. As células microbianas dentro dos biofilmes mostraram 10 a 1000 vezes mais resistência aos antibióticos do que as células planctônicas (MATH, 2012).

De acordo com Shi e colaboradores (2014) estima-se que, anualmente, ocorram cerca de 10 milhões de infecções associadas à biofilmes presentes em implantes ou decorrentes de procedimentos médicos invasivos. Estas infecções só podem ser tratadas pela remoção dos implantes, o que não só aumenta o custo do tratamento como também se torna um procedimento invasivo para os pacientes (MAH; O'TOOLE, 2001).

As infecções do biofilme relacionadas ao tecido hospedeiro são frequentemente crônicas, incluindo infecções pulmonares crônicas de pacientes com fibrose cística, osteomielite crônica, prostatite crônica, rino sinusite crônica, otite média crônica, feridas crônicas, infecção recorrente do trato urinário, endocardite, periodontite e cárie dentária (BURMOLLE et al., 2010). Algumas das principais infecções associadas ao biofilme que causam doenças humanas estão listadas na Tabela 1.

Tabela 1: Estirpes bacterianas envolvidas na infecção associada ao biofilme em superfícies aderentes

Espécie bacteriana	Infecção	Superfície
<i>Streptococcus mutans</i>	Cárie dentária	Dentes
	Endocardite	Enxertos vasculares
	Infecções nosocomiais	Suturas
<i>Staphylococcus spp.</i>	Feridas crônicas	Cateteres venosos
	Endocardite	Próteses
	Aparelho musculoesquelético	Ossos, ouvido médio
<i>Enterococcus faecalis</i>	Endocardite	Válvulas cardíacas
	Infecção do canal radicular	Cateteres urinários
		Dentes
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	Pneumonia	Pulmões
	Infecções do trato respiratório	
	ITU	
	Abcesso hepático piogênico	Fígado
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Infecções nosocomiais	Cateteres venosos
	Fibrose cística	Suturas
		Próteses
		Válvulas cardíacas
<i>Escherichia coli</i>	Prostatite bacteriana	Próteses e cateteres
	ITU	urinários
<i>Mycobacterium tuberculosis</i>	Tuberculose	Pulmões

Fonte: (SHARMA; MISBA; KHAN, 2019).

3.3 PLANTAS MEDICINAIS

Desde os primórdios da civilização, a natureza tem se apresentado como uma importante fonte medicinal para o alívio e tratamento de várias doenças que atingiram a humanidade. E por apresentarem substâncias biologicamente ativas, e estruturalmente diversas, as plantas medicinais foram amplamente utilizadas para tratar doenças agudas e crônicas (TAYE et al., 2011; LULEKAL et al., 2014).

As plantas medicinais representam o bio-recurso mais rico dos sistemas tradicionais da medicina. Estima-se que 14 – 28% das espécies de plantas superiores (gimnospermas e angiospermas) são utilizadas medicinalmente e que 74% dos componentes derivados destes preparados botânicos foram descobertos após o acompanhamento do uso etnobotânico (ABBAS, et al., 2017; KHAYAT et al., 2018).

De acordo com a OMS (apud NITHA; REMASHREE; BALACHANDRAN, 2012), cerca de 80 % da população mundial depende principalmente da medicina

tradicional baseada em plantas, especialmente para as necessidades básicas de saúde, sendo este conhecimento transmitido através das gerações.

Tabela 2: Ações dos principais metabólitos secundários

Metabolismo secundário	Espécime vegetal	Ação
Terpenoides	<i>Thymus vulgaris</i> L	Antisséptico
	<i>Caryophyllus aromaticus</i> L.	Anestésico
Saponinas	<i>Panax ginseng</i> C.	diurético, hipocolesterolemiante, antifúngico,
	<i>Glycyrrhiza glabra</i> L	expectorante e laxativa
Alcaloides	<i>Datura</i> spp.	Antimicrobiano
	<i>Papaver somniferum</i> L.	Analgésico
Antraquinonas	<i>Cathartus roseus</i> G	Antitumoral
	<i>Aloe barbadensis</i> M.	Purgativo
	<i>Cassia angustifolia</i> V.	
Taninos	<i>Psidium guaiava</i> L	Adstringente Cicatrizante; antisséptica; antidiarreica; antioxidante anti-inflamatória
Lignan	<i>Podophyllum hexadrum</i>	Anti-neoplásico
Flavonoides	<i>Ginkgo biloba</i> L.	Anti-inflamatório
	<i>Passiflora</i> spp;	Antioxidante
Glicosídeos cardiotônicos	<i>Digitalis lanata</i> L.	Insuficiência cardíaca
	<i>Digitalis purpurea</i> L.	
Cumarinas	<i>Mikania glomerata</i> S.	Anticoagulante
	<i>Mellilotus officinalis</i> L	

Fonte: adaptada de (SIMÕES, 2010)

Compostos antimicrobianos à base de plantas medicinais possuem grande potencial terapêutico, pois apresentam menores efeitos adversos quando comparados a fármacos sintéticos e também apresentam poucas chances de desenvolver resistência, pois podem ter mecanismos diferentes dos medicamentos convencionais (KUMAR; PANDEY, 2013; MISHRA et al., 2012).

Embora a diversidade química destas substâncias seja vasta, com números totais de mais de 200.000 estruturas, estima-se que os metabólitos

secundários isolados sejam menos de 10% do número total disponível nas plantas. Esses metabólitos são geralmente usados como mecanismos de defesa contra insetos, herbívoros e microrganismos. A grande variedade vem da capacidade das plantas de sintetizar um grande arsenal de compostos aromáticos e seus derivados substituídos por oxigênio (GHORBANI; ESMAELIZADEH, 2017; KIM et al., 2016).

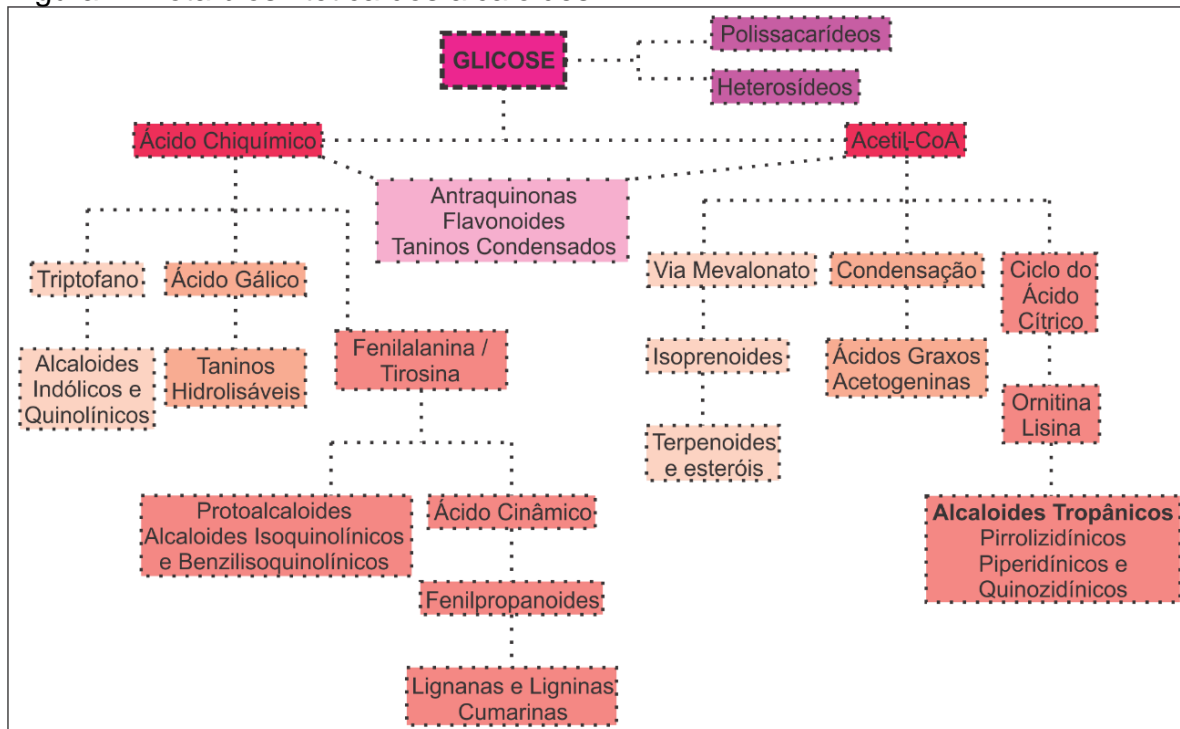
3.4 ALCALOIDES

De acordo com seus esqueletos de carbono, os alcaloides geralmente podem ser classificados como alcaloides semelhantes a indol, isoquinolina e piridina. No entanto, eles também podem ser classificados como ornitina, lisina, tirosina e alcaloides originados no triptofano de acordo com seus precursores bioquímicos (CUSHNIE et al., 2014; FU et al., 2014).

De acordo com Bunsupa e colaboradores (2012), os alcaloides também podem ser classificados como compostos nitrogenados heterocíclicos derivados do ácido chiquímico pela via do triptofano e fenilalanina e também derivados do acetil-CoA pela via do mavelonato e do ácido butírico (Figura 4) (cujo principal exemplo é a morfina, um dos primeiros alcaloides isolados em 1805 da *Papaver sonniferum* (FESSENDEN, 1982), tendo a codeína e heroína como seus derivados.

Nas plantas, os alcaloides são metabólitos secundários produzidos em resposta a modulações ambientais e estresse biótico ou abiótico, o que faz com que os alcaloides tenham tamanha diversidade estrutural e atividades biológicas significativas, tornando-os potenciais compostos candidatos ao desenvolvimento de novas drogas (MOREIRA et al., 2012; TAHA; EL-BAHR, 2009).

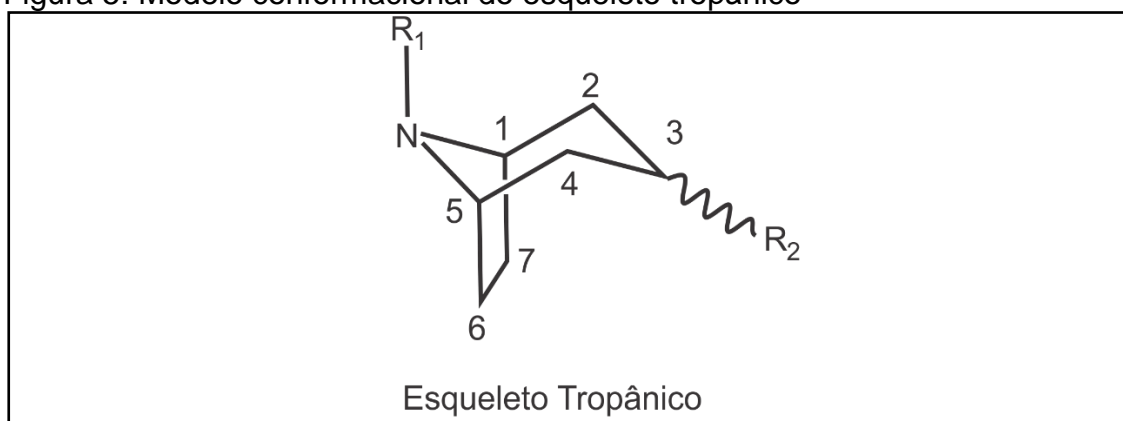
Figura 4: Rota biosintética dos alcaloides



Fonte: adaptado de (SIMÕES, 2010).

Os alcaloides tropânicos (ATs) são uma classe específica de alcaloides, derivados da via do ácido cítrico e podem ser mais especificamente definidos como compostos que possuem um sistema de anel de tropano (Figura 5) (QIU et al., 2018).

Figura 5: Modelo conformacional do esqueleto tropânico



Fonte: (KOHLEN-JOHANNSEN; KYSER, 2019).

Os ATs são ésteres de 3 α -tropanole (tropina) ou, em menor extensão, 3 β -tropanole (pseudotropina) e podem ser distinguidos em três grupos: ATs de

plantas de Solanaceae como hiosciamina e escopolamina, alcaloides de coca como cocaína de *Erythroxylum coca* e recentemente descoberto grupo de calistinas, que são alcaloides nortropânicos poli-hidroxiados (NTAs) ocorrendo principalmente em Convolvulaceae, Solanaceae, Moraceae, Erythrocyllaceae e Brassicaceae (DRAGER, 2003; GADZIKOWSKA; GRYNKIEWICZ, 2003).

O teor de ATs em *Datura* ssp. varia de 0,36 a 0,56%. Como o teor de escopolamina é bem maior que o de hiosciamina, todas as ações farmacológicas são derivadas àquele alcaloide. Os alcaloides podem ser encontrados em todas as partes de um vegetal, contudo em um ou mais órgãos haverá um acúmulo preferencial desta substância. Esse acúmulo ocorre principalmente em quatro tipos de tecidos ou células: 1) tecidos com crescimento ativo; 2) células epidérmicas e hipodérmicas; 3) bainhas vasculares e 4) vasos lactíferos (SIMÕES, 2010).

O local de estoque dos ATs frequentemente é diferente daquele no qual foram sintetizados, por exemplo, a síntese do sistema anelar básico dos alcaloides tropânicos ocorre nas raízes das espécies de *Datura*, sendo transportados para as folhas onde sofrem modificações consideráveis (SAMUELSSON, 1992).

Embora todos os AT apresentem um alto grau de similaridade, os efeitos farmacológicos destes compostos diferem significativamente. Estes podem formar ligações de hidrogênio com enzimas, receptores e proteínas, uma vez que eles têm, além de grupos funcionais, um átomo de nitrogênio receptor de prótons e um ou mais átomos de hidrogênio amina doadores de prótons. Os alcaloides têm muitas propriedades farmacológicas, como estimulantes do sistema nervoso central (brucina), agentes anticolinérgicos (atropina), atividade ocitócica e vasoconstritora (ergometrina) e atividade antimalárica, como a quinina (CUSHNIE et al., 2014; KIM et al., 2019; OTHMAN; SLEIMAN; ABDEL-MASSIH; 2019).

Alcaloides comumente isolados de plantas da família Ranunculaceae são conhecidos antimicrobianos (OMULOKOTI et al., 1997). Solanargine, um glicoalcaloide pode ser usado contra a infecção do HIV em infecções intestinais associadas a doença (MCMAHON et al., 1995). Vários alcaloides mostraram efeito microbicida frente às espécies de *Giardia* e *Entamoeba* (GHOSHAL et al., 1996). A berberina é um importante representante dos alcaloides, sendo

potencialmente efetivo contra tripanossomas (FREIBURGHHAUS et al., 1996) e plasmódios (OMULOKOTI et al., 1997).

A planta medicinal *Berberis vulgaris* produz tanto o alcaloide antibacteriano berberina quanto o inibidor da bomba de efluxo NorA 5'-metoxidinocarpina demonstrou que a sinergia destas substâncias desencadeou o desenvolvimento de rastreios para identificação de produtos vegetais que possuem atividade antibiótica contra bactérias Gram negativas (STERMITZ et al., 2000).

Sanguinarina, um alcaloide derivado de rizomas de *Sanguinaria canadensis* L., mostrou possuir atividade antiprotozoária, atividade antibacteriana contra bactérias Gram-positivas (incluindo aquelas resistentes à penicilina), bactérias Gram-negativas e fungos patogênicos (VICHKANOVA et al., 1969x).

3.5 GÊNERO *Datura* spp.

As espécies do gênero *Datura* pertencem a família Solanaceae e, de modo geral, são subarbustos eretos e ramificados, de até 1,5 m de altura, originárias no Himalaia, mas centralizada na Europa, América do Sul e Ásia e subespontânea no Brasil como planta ornamental e planta ruderal. São construídas de folhas membranácea, longo-pecioaladas, alternadas, irregularmente sinuado-denteadas, lisas, de cheiro desagradável e de sabor acre e amargo. Todas são venenosas e usadas como alucinógenas. Possuem folhas inteiras, recortadas e grandes flores tubulosas, em forma de corneta cuja cor varia com a espécie, do branco até roxo. Os frutos são cápsulas espinhosas deiscentes (LORENZI, 2008).

Duas espécies são exploradas comercialmente no Brasil para a obtenção de produtos fitoterápicos e para a extração de alcaloides: *D. stramonium* L., mais rica em hiosciamina e *D. metel* L., que produz principalmente escopolamina. A espécie *D. brugmansia* conhecida popularmente como trombeteiras e copo-de-leite, têm propriedades semelhantes, porém mais atenuadas (LORENZI, 2008).

O óleo das sementes de espécies deste gênero contém, principalmente, dois ácidos graxos insaturados (oleico e linoleico), além de alcaloides e triterpenoides. Essas plantas e seus alcaloides são utilizados na medicina

popular por suas ações anticonvulsivante, sedativa, e antiasmática (LORENZI, 2008).

3.6 *Datura suaveolens*

D. suaveolens (Figura 6) é conhecida popularmente como saia-branca, trombeteiro e sopro do diabo, é uma espécie originária do México e amplamente dispersa na América do Sul e muito presente no Brasil (LORENZI, 2008). Na medicina popular, as flores são usadas para o controle da dispneia asmática devido à ação dos alcaloides presentes em toda a parte da planta (LORENZI, 2008; SIMÕES, 2010).

Figura 6: Partes aéreas de *Datura suaveolens*



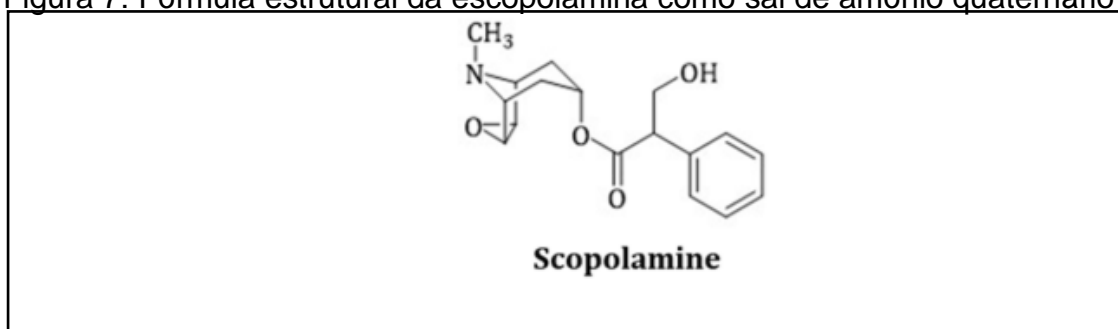
Fonte: Do autor.

Os passos iniciais para o isolamento de constituintes vegetais que apresentavam, empiricamente, conhecida ação farmacológica, trouxeram, a partir do século XVIII, muitas substâncias farmacologicamente ativos à terapêutica (CUNH; BORTOLOTTI, 2011).

Os principais constituintes ativos descritos para a espécie são os alcaloides tropânicos escopolamina e hiosciamina, além de triterpenoides. Esta espécie é conhecida por sua ação midriática e sedativa. (LORENZI, 2008).

A escopolamina (Figura 7) é uma substância do grupo dos alcaloides do tipo tropânico, encontrada em plantas da família Solanaceae, é um medicamento anticolinérgico derivado da tropina, que inibe competitivamente os receptores muscarínicos para acetilcolina, atuando como um antagonista não seletivo muscarínico, produzindo propriedades antimuscarínicas e efeitos pronunciados no sistema nervoso central, afetando a atividade locomotora, neurotransmissão e perda de memória (RENNER; OERTEL; KIRCH, 2005; GRYNKIEWICZ & GADZIKOWSKA, 2008).

Figura 7: Fórmula estrutural da escopolamina como sal de amônio quaternário



Fonte: (KOHNNEN-JOHANNSEN; KAYSER, 2019)

Suas aplicações clínicas incluem pré-medicação para anestesia obstétrica, analgesia, psicose e tratamento contra os tremores provocados pelo Mal de Parkinson. É também, usada para induzir déficits cognitivos transientes em casos de demência (CHRISTEN, 2000).

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 MATERIAL VEGETAL

As partes aéreas de *D. suaveolens* foram coletadas do bioma na cidade de Frederico Westphalen, Rio Grande do Sul, localizado na região Norte do estado, Linha Faguense, que tem por localização geográfica 27°21'38.0"S 53°24'50.0"W. O espécime vegetal foi coletado no estágio pleno desenvolvimento da floração (amostra de verão). A identificação botânica foi realizada a partir da confecção de uma exsicata depositada do herbário do Departamento de Engenharia Florestal da Universidade Federal de Santa Maria – UFSM, Rio Grande do Sul, para referência futura.

4.2 PROCEDIMENTO DE EXTRAÇÃO

As partes aéreas foram secas à temperatura ambiente (± 25 °C) e posteriormente pulverizadas em moinho de facas. Para a preparação do extrato bruto o material vegetal, seco e pulverizado, foi submetido à maceração com metanol, à frio. A solução obtida foi filtrada e pré-concentrada em evaporador rotatório sob pressão reduzida, a temperatura de até 40°C. Em seguida, o mesmo foi ressuspenso em 5 mL de metanol e secado em estufa, obtendo-se assim o extrato bruto.

4.3 ESTIRPES BACTERIANAS

Para este estudo foram utilizadas cepas bacterianas American Type Culture Collection (ATCC) padrão e isolados clínicos de bactérias gram-positivas e gram-negativas (Tabela 1), fornecidas pelo Departamento de Microbiologia e Parasitologia e pelo Laboratório de Análises Clínicas (LAC) do Hospital Universitário de Santa Maria (HUSM). Os experimentos foram realizados nas dependências do Laboratório de Pesquisas em Microbiologia Oral (LAPEMICRO), prédio 20, da UFSM.

Tabela 3: Microrganismos utilizados

MICROORGANISMO	ESTIRPES
<i>Salmonella</i> sp	Isolado clínico
<i>Streptococcus</i> sp	Isolado clínico
<i>Listeria monocitogenes</i>	ATCC 7644
<i>Morganella morganii</i>	Isolado clínico
<i>Serratia</i> sp	Isolado clínico
<i>Enterococcus faecalis</i>	Isolado clínico
<i>Escherichia coli</i>	ATCC 35218
<i>Escherichia coli</i>	ATT8739
<i>Escherichia coli</i>	ATCC 25922
<i>Salmonela enteritidis</i>	Isolado clínico
<i>Staphylococcus saprophyticus</i>	Isolado clínico
<i>Shigella flexneri</i>	ATCC 12022323 ^a
<i>Salmonela enteritidis</i>	Isolado clínico
<i>Salmonela enteritidis</i>	Isolado clínico
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	PNCQ Proex 340
<i>Providencia rettgeri</i>	ATCC 2994
<i>Proteus mirabilis</i>	ATCC 25933
<i>Acinetobacter</i> sp	Isolado clínico
<i>Staphylococcus aureus</i>	Isolado clínico
<i>Streptococcus agalactiae</i>	Isolado clínico
<i>Morganella morganii</i>	Isolado clínico
<i>Acinetobacter baumannii</i>	Isolado clínico
<i>Enterobacter aerogenes</i>	ATCC 13048
<i>Streptococcus pyogenes</i>	Isolado clínico
<i>Staphylococcus aureus</i>	ATCC 6538
<i>Enterococcus faecium</i>	ATCC 6538
<i>Shigella sonnei</i>	Isolado clínico
<i>Acinetobacter baumannii</i>	ATCC 19606
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	ATCC 35985
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	ATCC 27853
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	ATCC 1705
<i>Staphylococcus aureus</i>	ATCC 33691
<i>Burkholderia cepacia</i>	Isolado clínico
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	ATCC 14606
<i>Staphylococcus haemolyticus</i>	Isolado clínico
<i>Staphylococcus hominis hominis</i>	Isolado clínico
<i>Escherichia coli</i> (lactose –)	Isolado clínico
<i>Staphylococcus aureus</i>	Isolado clínico
<i>Streptococcus agalactiae</i>	Isolado clínico
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	Isolado clínico
<i>Citrobacter freundii</i>	ATCC 8090
<i>Serratia marcescens</i>	ATCC8100
<i>Proteus vulgaris</i>	ATCC 39882
<i>Salmonella typhimurium</i>	ATCC 14028
<i>Enterococcus faecalis</i>	ATCC 29212
<i>Haemophilus influenza</i>	ATCC 49247

<i>Streptococcus pneumoniae</i>	ATCC 99619
<i>Aeromonas caviae</i>	Isolado clínico
<i>Streptococcus mutans</i>	Isolado clínico
<i>Streptococcus oralis</i>	Isolado clínico
<i>Streptococcus salivaris</i>	Isolado clínico
<i>Staphylococcus aureus</i>	ATCC 29213
<i>Enterococcus faecalis</i>	ATCC 29212
<i>Staphylococcus saprophyticus</i>	ATCC BAA 750
<i>Escherichia coli</i>	ATCC 35218
<i>Staphylococcus aureus</i>	ATCC BAA 1026
<i>Staphylococcus aureus</i>	ATCC BAA 976
<i>Stebotrophomonas maltophilia</i>	ATCC 17666
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	ATCC 700603
<i>Enterococcus faecalis</i>	ATCC 51299
<i>Enterobacter cloacae</i>	ATCC 700327
<i>Enterococcus casseliflavus</i>	ATCC 700327
<i>Staphylococcus aureus</i>	ATCC BAA 977
<i>Escherichia coli</i>	ATCC 25922
<i>Escherichia coli</i>	Isolado clínico
<i>Escherichia coli</i> (lactose -)	Isolado clínico
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> (PA 01)	

4.4 MEIOS DE CULTIVO E INÓCULO BACTERIANO

Colônias isoladas foram cultivadas por 18-24 h em placas contendo Mueller Hinton Agar (Himedia) e o inóculo preparado em solução salina (NaCl 0,9%) com densidade ajustada para 0,5 na escala de McFarland ($1,5 \times 10^8$ UFC/mL), conforme preconizado pelo *Clinical & Laboratory Standards Institute* (CLSI) (2018, protocolo M07). Os ensaios microbiológicos foram realizados utilizando Mueller-Hinton Agar e Mueller-Hinton Broth (Sigma-Aldrich®). Todos os meios de cultura e materiais utilizados foram auto clavados a 121 °C por 15 minutos em autoclave vertical, com exceção da placa de 96 poços.

4.5 TESTE DE DISCO-DIFUSÃO

O teste de disco-difusão em ágar Muller Hinton foi escolhido como teste de triagem, seguindo os parâmetros do CLSI (2018, protocolo M100), visando a seleção de cepas suscetíveis ao extrato bruto, preparado na concentração de 40 mg/mL. Os meios foram preparados em placas de Petri, previamente autoclavadas, com espessura de 4 mm e o tempo de incubação foi de 24h em estufa bacteriológica (VichLab®), a 37°C.

As cepas tratadas com o extrato bruto que apresentaram halo de inibição foram submetidas ao ensaio de microdiluição em caldo. Um controle negativo foi realizado, utilizando apenas o disco e um controle de solvente impregnando o disco com 10% Twen 80®, 70% água destilada e 20% DMSO.

4.6 DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO INIBITÓRIA MÍNIMA (CIM)

A atividade antibacteriana do extrato bruto foi avaliada pelo método de microdiluição em caldo. O ensaio foi realizado em placas de microtitulação de 96 poços utilizando Caldo Muller Hinton (Himedia), empregando as cepas com atividade no *screening* inicial. O extrato diluído de origem a concentrações variadas de 0,0390 a 20 mg/mL. 15 µL de inóculo bacteriano foi misturado em cada diluição do extrato, as placas incubadas 37 °C e a CIM registrada após 24h de incubação. As CIMs foram definidas como a menor concentração do extrato que inibe o crescimento bacteriano visível. Este experimento seguiu as recomendações do CLSI (2018, protocolo M07), realizado em triplicata utilizando o cloreto de 2,3,5-trifeniltetrazólio como indicador de crescimento bacteriano. Também foi realizado um controle positivo com inóculo e caldo, um controle negativo com extrato e caldo e um controle de solvente com Tween 80®, água destilada e DMSO (1:7:2), inóculo e caldo MH.

4.7 QUANTIFICAÇÃO DE BIOFILME

Cinco isolados clínicos de *K. pneumoniae* foram submetidas ao ensaio de quantificação de biofilme em microplacas de 96 poços conforme preconizado no estudo de Stepanovic e colaboradores (2007, adaptado).

O inóculo bacteriano foi preparado a partir do cultivo bacteriano em placa de ágar MH na escala 0,5 McFarland, e então 20 µL desta suspensão foi adicionada a 180 µL de caldo MH, em triplicata, para cada microrganismo, na placa de 96 poços. A placa foi coberta e incubada por 24h a 37°C sob condições estáticas.

Após a incubação, o conteúdo dos poços é descartado em um recipiente, posteriormente autoclavável. Cada poço é lavado três vezes com 300 µL de água destilada, utilizando uma micropipeta apropriada, para a lavagem das células

não aderidas. Após a lavagem, as bactérias aderidas foram fixadas a temperatura ambiente por 60 minutos.

A camada aderente de biofilme formada em cada placa de microtitulação foi corada com 150 µL de cristal violeta usada para coloração de Gram (cristal violeta de Hucker a 1%) durante 15 min à temperatura ambiente. Após a coloração, a solução foi aspirada com uma pipeta de Pasteur e o excesso retirado sob água corrente.

Após este procedimento, 150 µL de metanol foi adicionado a cada poço para ressuspender as células aderidas, as mesmas foram transferidas para uma nova microplaca e a leitura realizada em leitor de placas elisa em densidade óptica (DO) de 570 nm. Um controle negativo foi realizado utilizando apenas caldo MH e um controle positivo foi realizado utilizando *P. aeruginosa* PA01, sendo este último um forte produtor de biofilme.

Para a interpretação dos resultados, considera-se:

$DOc = DO \text{ média do controle negativo} + (3 \times \text{Desvio Padrão controle negativo})$

Se:

$DOc \leq DOf =$ não produtor de biofilme

$DOc < DOf \leq 2 \times DOc =$ fraco

$2 \times DOc < DOf \leq 4 \times DOc =$ moderado

$4 \times DOc < DOf =$ forte produtor de biofilme

4.8 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIBIOFILME

Para esta técnica foram utilizadas placas de 96 poços convencionais como material de adesão, seguindo o protocolo descrito por Bonez e colaboradores (2013). Como controle positivo para formação de biofilme, foi utilizada a cepa padrão PA01 de *P. aeruginosa*. Suspensões bacterianas foram preparadas em caldo MH (Himedia ®, Mumbai, Índia), ajustadas à escala de 0,5 McFarland e incubadas por 24 horas a 37 ° C para promover a adesão.

O biofilme formado foi revelado pela técnica do cristal violeta. Após a incubação, lavagens sucessivas foram realizadas com solução fisiológica para

remover as células fracamente aderidas. Em seguida, 200 μ L de 0,1% de suspensão de cristal violeta foram adicionados aos poços e deixados em repouso por 10 min. As placas foram subsequentemente lavadas novamente, e 200 mL de etanol a 95% foram adicionados por 15 min. Finalmente, o etanol foi transferido para outra placa para leitura da densidade óptica (OD) a 570 nm, utilizando um TP - Reader [®] (Thermo Plate, Inc., Ohio, EUA) (BONEZ et al., 2013).

4.8.1 Inibição do biofilme

Para a técnica de inibição do biofilme, foi aplicado o tratamento com o extrato bruto na sua CIM e em concentrações subinibitórias no momento da formação do biofilme. A densidade óptica a 570 nm em relação ao padrão de *P. aeruginosa* determinou o potencial do extrato em inibir a formação do biofilme.

4.8.2 Destruição do biofilme

Para a técnica de destruição do biofilme, o tratamento foi aplicado 24h após a formação do biofilme na CIM e em concentrações subinibitórias do extrato bruto. A densidade óptica a 570 nm em relação ao padrão de PA01 determinou o potencial do extrato em destruir o biofilme formado.

4.9 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os dados foram relatados como média \pm desvio padrão e foram analisados com o software Graphpad Prism 7 (GraphPad Inc., San Diego, CA, EUA) que utilizou ANOVA unidirecional seguido do ajuste de comparação com o teste de Tukey para determinar a significância estatística de 5%.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

O material vegetal coletado foi identificado pelo Herbário do Departamento de Ciências Florestais da UFSM, Santa Maria, RS, pertencente a família Solanaceae, gênero e espécie *Brugmansia suaveolens*, sendo *Datura suaveolens* seu sinônimo, tendo como número de registro da coleta HDCF 7537.

Os resultados incluídos neste estudo evidenciaram que dos 67 microrganismos testados apenas 12 se mostraram sensíveis ao extrato bruto de *D. suaveolens*, na concentração de 20 mg/mL, revelando variações na suscetibilidade dos microrganismos entre isolados clínicos e cepas padrões (Tabela 4).

Tabela 4: Resultados do ensaio de disco-difusão

MICROORGANISMO	CEPA	MÉDIA ± DP
<i>Acinetobacter baumannii</i>	Isolado clínico	13,66 mm ± 0,11
<i>Acinetobacter baumannii</i>	ATCC 19606	21,66 mm ± 0,13
<i>Shigella sonnei</i>	Isolado clínico	7,15 mm ± 0,17
<i>Enterobacter aerogenes</i>	ATCC 13048	7,24 mm ± 0,15
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	ATCC 35985	6,15 mm ± 0,13
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	Isolado clínico	6,75 mm ± 0,05
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	ATCC 1705	7,33 mm ± 0,08
<i>Escherichia coli</i>	Isolado clínico	8,44 mm ± 0,13
<i>Streptococcus agalactiae</i>	Isolado clínico	14,43 mm ± 0,12
<i>Enterococcus faecalis</i>	ATCC 29212	8,26 mm ± 0,06
<i>Streptococcus pneumoniae</i>	ATCC 99619	14,30 mm ± 0,02
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	PA01	17,05 mm ± 0,05

É possível corroborar este estudo com a atividade antimicrobiana do extrato etanólico de folhas *Catharanthus roseus* (100 mg/mL), testada no estudo de Khalil (2012). *C. roseus* contém mais de 90 alcaloides diferentes, estruturalmente semelhantes aos encontrados em plantas do gênero *Datura*, e é amplamente distribuída pelo país. Utilizando o método de difusão em disco, a zona de inibição foi de 15, 12 e 11 mm contra *Staphylococcus aureus*, *Candida albicans* e *Eschechiria coli*, respectivamente.

A atividade antibacteriana de extratos alcaloídicos das folhas de *Solanum nigrum* (erva-moura), foi testada contra *K. pneumoniae*, *P. aeruginosa* e *E. coli*, no estudo conduzido por Jasim e colaboradores (2015), e os resultados do

método disco-difusão mostraram que todas as cepas foram sensíveis ao extrato metanólico das folhas, sendo a atividade melhor que a dos antibióticos testados (canamicina, cefotaxima, penicilina, estreptomicina e rifampicina).

As CIMs e as CBMs se apresentaram entre 10 – 1,25 mg/mL e 10 – 5 mg/mL, respectivamente (Tabela 5). No estudo desenvolvido por Al-Bayati e Sulaiman (2008) os extratos aquosos de *Salvadora persica* L. (árvore de mostarda) que contém alcaloides tropânicos em sua composição exibe propriedades antimicrobianas contra *P. aeruginosa*, *S. aureus* e *Candida albicans*, com CIM, entre 100 – 300 mg/mL.

Tabela 5: Concentração Inibitória e Bactericida Mínimas

MICROORGANISMO	CEPA	CIM (mg/mL)	CBM (mg/mL)
<i>Acinetobacter baumannii</i>	Isolado clínico	10	≥ 10
<i>Acinetobacter baumannii</i>	ATCC 19606	5	≥ 10
<i>Shigella sonnei</i>	IC	10	≥ 10
<i>Enterobacter aerogenes</i>	ATCC 13048	10	≥ 10
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	ATCC 35985	2,5	≥ 5
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	IC	5	≥ 5
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	ATCC 1705	2,5	≥ 5
<i>Escherichia coli</i>	IC	2,5	≥ 5
<i>Streptococcus agalactiae</i>	IC	5	≥ 10
<i>Enterococcus faecalis</i>	ATCC 29212	2,5	≥ 5
<i>Streptococcus pneumoniae</i>	ATCC 99619	2,5	≥ 10
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	PA01	1,25	≥ 10

O estudo de Sher e colaboradores (2011) revelou que os diâmetros da zona de inibição variaram de 12,6 a 22,3 mm para o extrato aquoso e de 9,2 a 15,7 mm para o extrato metanólico, ambos de *S. persica*, utilizando o método de difusão em ágar contra *P. aeruginosa*, com uma CIM de 7,34 mg/mL.

Polygonum aviculare L. (erva-da-muda), amplamente distribuído em regiões áridas, é rico em alcaloides e flavonoides e demonstrou atividade antimicrobiana do extrato clorofórmico e etanólico dos caules e folhas de *P. aviculare* L. contra *E. coli* e *P. aeruginosa*, e *C. albicans* revelando uma zona de diâmetro de inibição entre 14 e 28 mm para o extrato do caule e entre 8 e 12 mm para o extrato da folha (SALAMA; MARRAIKI, 2010).

Os alcaloides são substâncias estruturalmente diversas que demonstraram ter atividade antimicrobiana (como quinolonas, metronidazol ou outros) através da inibição da atividade enzimática ou outros mecanismos, como

inibição da divisão celular, inibição respiratória e enzimática, ruptura da membrana bacteriana e afetando os genes de resistência (RAO; VENKATACHALAM, 2000).

Os alcaloides inibem a atividade da diidrofolato redutase, inibindo assim a síntese do ácido nucleico. A diidrofolato redutase é uma enzima crucial na produção de precursores de pirimidina e purina para a biossíntese de aminoácidos, RNA e DNA (RAO; VENKATACHALAM, 2000).

A proteína FtsZ é importante na divisão celular bacteriana e é o homólogo procariótico da tubulina eucariótica. Berberina, um alcaloide, liga-se à proteína FtsZ com alta afinidade, causando a inibição da montagem de FtsZ e sua atividade GTPase, levando ao alongamento celular, que causa inibição da divisão celular (BOBEREK; STACH; GOOD, 2010). Todos os alcaloides de quinolona que ocorrem naturalmente são conhecidos por não possuírem o grupo 3-carboxi, que é importante para ligação e bloqueio de complexos de topoisomerase II A do tipo DNA, afetando a divisão celular (HEEB et al., 2011).

Além disso, os alcaloides de alquil-metil-quinolona apresentam uma atividade antibacteriana forte e específica, através da inibição respiratória, contra o *H. pylori* (TOMINAGA et al., 2002). Já a esqualamina, um alcaloide poliamina, age através da ruptura das paredes externas das Gram-negativas e despolariza as membranas bacterianas das bactérias Gram-positivas (ALHANOUT et al., 2010).

O potencial terapêutico das substâncias majoritárias de *D. suaveolens* em comparação com os achados da literatura são importantes, pois as doenças infecciosas são a principal causa de morte do mundo. *K. pneumoniae* e *Pseudomonas spp.* estão surgindo como uma importante causa de infecção nosocomial neonatal. *E. coli* como causa de septicemias e diarreia, podendo infectar a vesícula biliar, meninges, feridas cirúrgicas, lesões de pele e pulmões, especialmente em pacientes debilitados e imunodeprimidos (PANDEY, 2005; MISHRA et al., 2012).

No estudo realizado por Tagrante e colaboradores (2008) 36% (n = 236) dos recém-nascidos de uma Unidade de Cuidados Intensivos Neonatal apresentaram hemocultura positiva, sendo a *K. pneumoniae* (47%) e *P. aeruginosa* (20%) os microrganismos mais prevalentes.

Ao analisar 79 pacientes críticos internados em Unidade de Terapia Intensiva Adulto do Hospital de Clínicas da Universidade Federal de Uberlândia, Gomides e colaboradores (2014) realizaram o isolamento de *Acinetobacter baumannii* (61%, 58/94), *K. pneumoniae* (18%, 17/94) e *P. aeruginosa* (11,7%, 11/94), sendo 81% destes isolados (64 pacientes) resistentes aos carbapenêmicos.

Ademais, as infecções bacterianas, principalmente por microrganismos MDR, não se limitam ao ambiente nosocomial, mas também podem ocorrer na comunidade. O estudo de Oliveira e colaboradores (2016) revela que, das infecções analisadas em uma unidade básica de saúde, 52,2% (n = 90) se tratavam de infecções do trato respiratório, sendo necessário um atendimento especializado.

No que se refere ao biofilme bacteriano, o extrato bruto de *D. suaveolens* não foi capaz de destruir o biofilme de *P. aeruginosa* (Figura 8). Entretanto, para a inibição da formação do biofilme houve uma discreta redução de 39,31% da formação do biofilme em concentrações subinibitórias quando comparado com o controle positivo (Figura 9).

Figura 8: Destruição do biofilme de *P. aeruginosa* (PA01)

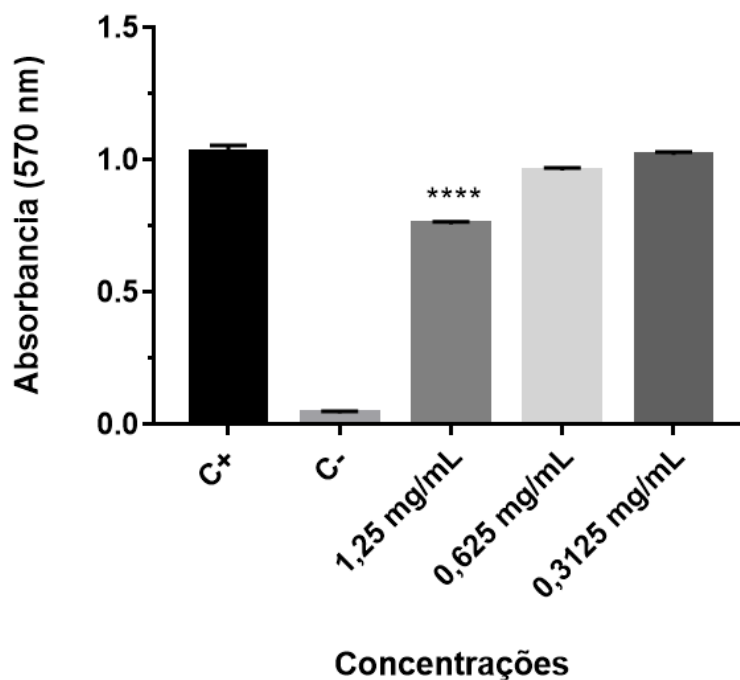


Fig. 8. Densidade óptica de *P. aeruginosa* (PA 01) em relação as diferentes concentrações testadas. (****) Diferença estatística significativa entre o controle positivo e a concentração correspondente

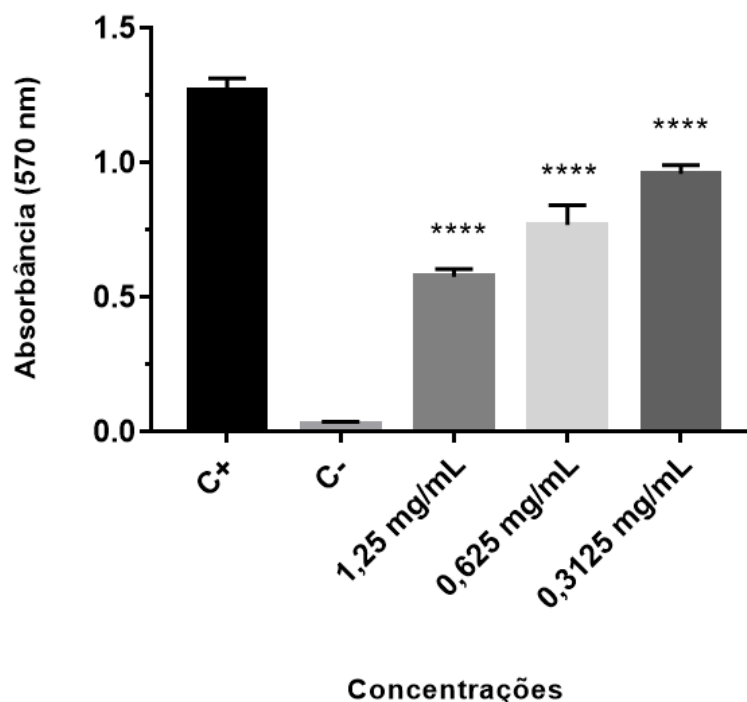
Figura 9: Inibição da formação de biofilme em *P. aeruginosa* (PA01)

Fig. 9. Densidade óptica de *P. aeruginosa* (PA01) em relação as diferentes concentrações testadas. (****) Diferença estatística significativa entre o controle positivo e a concentração correspondente.

No que se refere a quantificação de biofilme em isolados clínicos de *K. pneumoniae*, todos os microrganismos foram classificados como fortes produtores de biofilme, conforme o método preconizado por Stepanovic (2007) (Tabela 6).

Tabela 6: Quantificação de biofilme em isolados clínicos de *K. pneumoniae*

MICROORGANISMO	4 x OD _c < OD = forte produtor de biofilme	RESULTADO
KP1	4 x 0,148 < 1,227 0,592 < 1,227	Forte produtor de biofilme
KP2	4 x 0,062 < 0,780 0,248 < 0,780	Forte produtor de biofilme
KP3	4 x 0,142 < 0,601 0,568 < 0,601	Forte produtor de biofilme
KP4	4 x 0,142 < 0,601 0,568 < 0,601	Forte produtor de biofilme
KP5	4 x 0,141 < 0,998 0,564 < 0,998	Forte produtor de biofilme

A partir deste resultado, a cepa que mais produziu biofilme foi selecionada para os testes de destruição e inibição da formação de biofilme, sendo a sua CIM e CBM de 2,5 e 10 mg/mL, respectivamente. O extrato bruto de *D. suaveolens* não foi capaz de destruir o biofilme após 24h de tratamento (Figura 10), entretanto houve uma discreta redução da formação de biofilme (26,13%) quando o tratamento foi aplicado juntamente com o inóculo bacteriano (Figura 11).

Figura 10: Destruição de biofilme em isolado clínico de *K. pneumoniae*

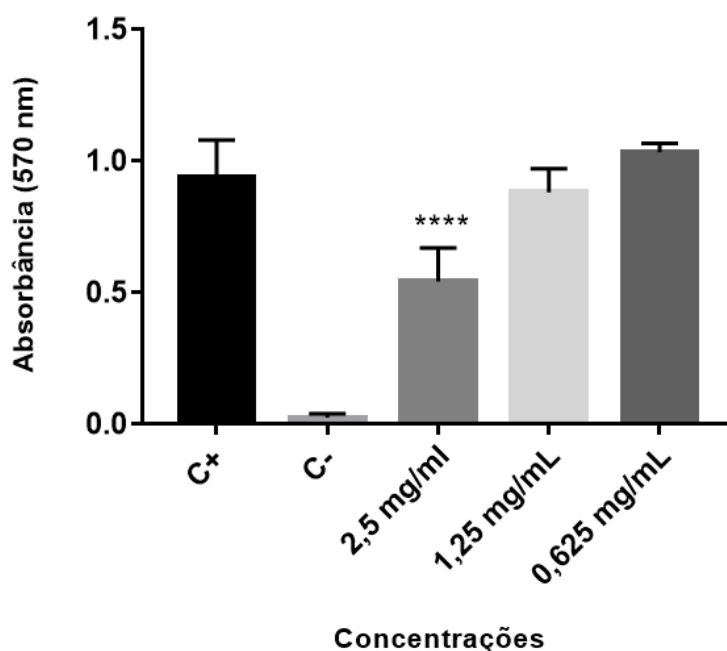


Fig. 10. Densidade óptica de *K. pneumoniae* em relação as diferentes concentrações testadas. (****) Diferença estatística significativa entre o controle positivo e a concentração correspondente.

Devido à sua alta patogenicidade, *K. pneumoniae*, na era pré-antibiótica, foi considerada como um importante agente causador de infecções adquiridas na comunidade, incluindo uma forma grave de pneumonia, especialmente em pacientes alcoólatras e diabéticos. Nos últimos anos, enquanto a pneumonia por infecções adquiridas na comunidade causada por esse patógeno tornou-se rara, novas manifestações de infecções por *K. pneumoniae*, incluindo abscessos hepáticos, infecções metastáticas (FUURSTED et al., 2012), frequentemente causadas por cepas altamente virulentas de sorotipos específicos, (SANCHEZ

et al., 2013), bem como recorrentes infecções do trato urinário (ITUs) (LIN et al., 2014), tem sido descritas.

Em geral, um estudo de coorte indicou que a maioria das infecções associadas a diferentes dispositivos médicos, incluindo cateteres urinários e intravasculares, foi causada por *K. pneumoniae* e uma alta porcentagem (cerca de 90%) de bactérias produtoras de biofilme, sendo os isolados causadores de infecção eram multirresistentes (SINGHAI et al., 2012).

K. pneumoniae foi relatada ser capaz de crescer *in vitro* como biofilme desde o final da década de 1980 (LE CHEVALLIER; CAWTHON; LEE, 1988), mas a evidência clara de um biofilme *in vivo* foi fornecida apenas em 1992 por Reid e colaboradores, que investigaram por microscopia eletrônica de varredura algumas células epiteliais da bexiga de um paciente com ITU assintomática causada por *K. pneumoniae*.

Posteriormente, estudos *in vitro* demonstraram que cerca de 40% de *K. pneumoniae* isolados não só de urina, mas também de escarro, sangue e swabs de ferida, foram capazes de produzir biofilme (YANG; ZHANG, 2008), bem como cerca de 63% das amostras de urina de pacientes cateterizados que sofrem de ITUs foram positivos para a produção *in vitro* de biofilme de *K. pneumoniae* (NIVEDITHA et al., 2012). Recentemente, também foi relatado que uma alta taxa de cepas de *K. pneumoniae* isoladas de tubos endotraqueais de pacientes afetados por pneumonia associada à ventilação mecânica é capaz de formar um biofilme (SINGHAI et al., 2012).

Figura 11: Inibição da formação de biofilme de *K. pneumoniae*

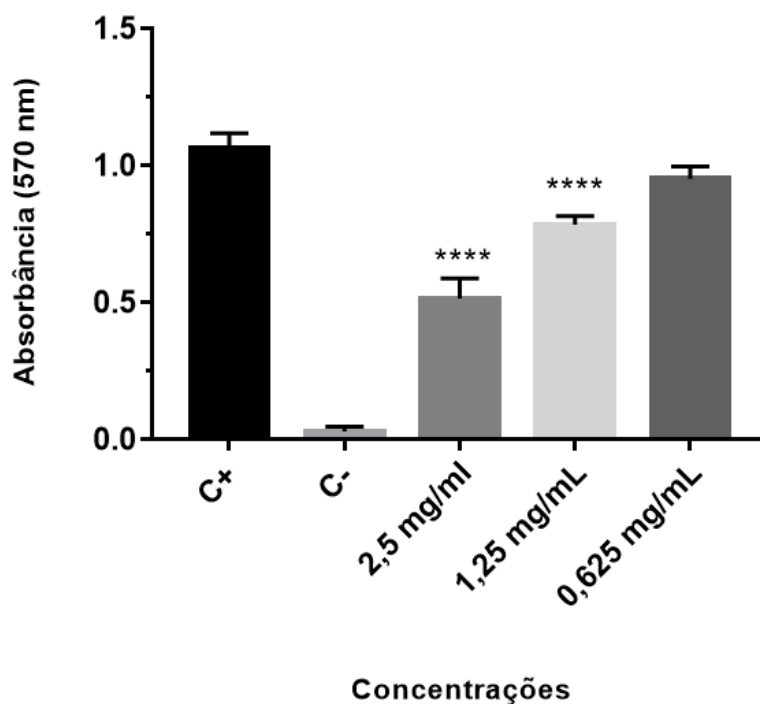


Fig. 11. Densidade óptica de *K. pneumoniae* em relação as diferentes concentrações testadas. (****) Diferença estatística significativa entre o controle positivo e a concentração correspondente.

Muitos produtos naturais derivados de plantas possuem funções antimicrobianas e anti-biofilme *in vitro*. Uma variedade de moléculas derivadas de plantas naturais ou extrato de ervas medicinais, bem como os mecanismos subjacentes na função anti-biofilme foram identificados. Os efeitos anti-biofilme dos produtos naturais baseiam-se principalmente nos seguintes aspectos: inibição da formação de matriz polimérica, supressão da adesão e fixação celular, interrupção da produção de matriz extracelular e diminuição da produção de fatores de virulência, bloqueando assim a rede QS e o desenvolvimento do biofilme (LU et al., 2019; LI; LEE, 2017).

Tem sido demonstrado que os biofilmes jovens são muito mais suscetíveis aos antimicrobianos do que os biofilmes mais desenvolvidos (HENGZHUANG; WU; CIOFU, 2013), ressaltando a importância de intervenções precoces no tratamento de infecções por biofilme. A principal consequência clínica da tolerância de biofilmes a antibióticos é que a alta concentração de antimicrobianos necessária para o tratamento de infecções por biofilme

(MARTINEZ-SOLANO et al., 2008) não pode ser alcançada *in vivo* por administração sistêmica sem toxicidade (HENGZHUANG; WU; CIOFU, 2012).

Proporcionar altas concentrações de antimicrobianos por meio da administração tópica, fármacos combinados e terapias sequenciais ou o uso de adjuvantes para melhorar a eficácia dos mesmos são estratégias terapêuticas empregadas ou que têm sido propostas para tratar infecções por biofilme (HØIBY et al., 2010; HØIBY et al., 2011).

Pelo fato de ambas bactérias gram-negativas apresentarem resultado promissor para a inibição de biofilme, supõe-se que o extrato bruto de *D. suaveolens* atua nas fases iniciais da formação de biofilme, em concentrações subinibitórias, limitando sua adesão. Este resultado corrobora com o estudo de Yan-Hua e colaboradores (2018) que demonstraram que o extrato aquoso de *Rhizoma Coptidis* inibe a formação de biofilme de *Streptococcus suis*, em concentrações subinibitórias. Este achado é importante, pois o extrato em sua concentração inibitória causaria a morte da população bacteriana.

6 CONCLUSÃO

A quantificação de isolados clínicos de *K. pneumoniae* provenientes do HUSM revelou estas estirpes bacterianas como forte produtoras de biofilme, evidenciando seu potencial virulento em infecções nosocomiais.

No ensaio semi-quantitativo de biofilme, tanto por *P. aeruginosa* (PA01) como por *K. pneumoniae*, o extrato bruto não foi capaz de destruir o biofilme nas concentrações subinibitórias. Entretanto, o extrato bruto de *D. suaveolens* apresenta uma atividade discreta no ensaio de inibição do biofilme, em concentrações subinibitórias, de 0,625 mg/mL e 1,25 mg/mL para *P. aeruginosa* (PA01) e *K. pneumoniae*, respectivamente.

Neste sentido, o extrato bruto de *D. suaveolens* apresenta-se como uma alternativa promissora aos problemas de resistência bacteriana por ser uma alternativa ecologicamente correta e por oferecer uma variedade de substâncias muito bem descritos na literatura.

7 PERSPECTIVAS FUTURAS

Ainda que os objetivos deste trabalho tenham sido alcançados é necessário que estudos complementares sejam realizados, visando um melhor deslumbre sobre os mecanismos pelos quais *D. suaveolens* se apresenta como potencial agente antimicrobiano.

Assim, sugere-se:

- Expandir o estudo para o fracionamento do extrato bruto do material vegetal em questão;
- Utilizar microscopia de força atômica para melhor avaliar e corroborar com os ensaios de inibição da formação do biofilme;
- Caracterizar fenotipicamente os biofilmes por meio de testes de hidrofobicidade, autoagregação e coagregação celular;
- Avaliar efeito anti-QS do material vegetal;
- Realizar ensaios de cito e genotoxicidade, a fim de determinar as concentrações tóxicas do material vegetal;
- Realizar estudos nanotecnológicos, a fim de potencializar a ação antibacteriana e antibiofilme;
- Testar novas estratégias de controle de biofilme baseadas na combinação de antimicrobianos e biocidas;

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABBAS, M; SAEED, F; ANJUM, F. M; AFZAAL, M; TUFAIL, T; BASHIR, M. S. Natural polyphenols: an overview. **International Journal of Food Properties**, v. 20, p. 1689 – 1699, 2017.

AGUIAR, L. et al. Infecções hospitalares e seus impactos financeiros. **Arquivos Catarinenses de Medicina**, v. 32, supl. n. 1, 2002.

AL-BAYATI, F. A. E; SULAIMAN, K. D. In vitro antimicrobial activity of *Salvadora persica* L. extracts against some isolated oral pathogens in Iraq. **Turkish Journal of Biology**, v. 32, p. 57 – 62, 2008.

ALHANOUT, K., MALESINKI, S., VIDAL, N., PEYROT, V., ROLAIN, J. M., BRUNEL, J. M. New insights into the antibacterial mechanism of action of squalamine. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 65, p. 1688 – 1693, 2010.

ALMAGOR, J. et al. The impact of antibiotic use on transmission of resistant bacteria in hospitals: Insights from an agent-based model. **PLOS ONE**, p. 1–14, 2018.

ANDRADE, J. M. et al. *Rosmarinus officinalis* L.: an update review of its phytochemistry and biological activity. **Future Science AO**, v. 4, n. 4, 2018.

ASFOUR, H. Z. Anti-Quorum sensing natural compounds. **Journal of Microscopy and Ultrastructure**, v. 6, n. 1, 2018.

BOBEREK, J. M; STACH, J; GOOD, L. Genetic evidence for inhibition of bacterial division protein FtsZ by berberine. **PLoS ONE**, v. 5:e13745, 2010.

BONEZ, P. C. et al. Chlorhexidine activity against bacterial biofilms. **American Journal of Infection Control**, v 41, n. 12, p. 119 – 122, 2013.

BUNSUPA, S; YAMAZAKI, M; SAITO, K. Quinolizidine alkaloid biosynthesis: recent advances and future prospects. **Frontiers in Plant Science**, v. 3, n. 239, 2012.

BURMOLLE, M; THOMSEN, T. R; FAZLI, M; DIGE, I; CHRISTENSEN, L; HOMOE, P; TVEDE, M; NYVAD, B; TOLKER-NIELSEN, T; GIVSKOV, M; MOSER, C. Biofilms in chronic infections – a matter of opportunity – monospecies biofilms in multispecies infections. **FEMS Immunology and Medical Microbiology**, v. 59, p. 324 – 236, 2010.

CHRISTEN, P. Tropane alkaloids: old drugs used in modern medicine, In Atta-ur-Rahman. **Studies in Natural Products Chemistry**, v. 22, Elsevier, 2000.

CLSI. **Clinical and Laboratory Standards Institute**. Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically: approved standard. 7th ed. CLSI document M7 – A7. Wayne [PA], Clinica, and Laboratory and Standards Institute, 2018.

COSTERTON, J. W; MONTANARO, L; ARCIOLA, C. R. Biofilm in implant infections: its production and regulation. **International Journal of Artificial Intelligence Research**, v. 28, p. 1062 – 1068, 2005.

CUNHA, S. A; BORTOLOTO, I. M. Ethnobotany of medicinal plants in the Monjolinho settlement, Anastácio, Mato Grosso do Sul, Brazil. **Acta Botanica Brasilica**, v. 25, n. 3, 2011.

CUSHNIE, T. T. et al. Alkaloids: An overview of their antibacterial, antibiotic-enhancing and antivirulence activities. **International Journal Antimicrobial Agents**, v. 44, p. 377 – 386, 2014.

DEEP, A; CHAUDHARY, U; GUPTA, V. Quorum sensing and bacterial pathogenicity: From molecules to disease. **Journal of Laboratory Physicians**, v. 3, p. 4 – 11, 2011.

DONG, S. J; LIN, X. H; LI, H. Regulation of *Lactobacillus plantarum* contamination on the carbohydrate and energy related metabolisms of *Saccharomyces cerevisiae* during bioethanol fermentation. **International Journal of Biochemistry & Cell Biology**, v. 68, p. 33 – 41, 2015.

DRAGER, B. Chemistry and Biology of calystegines. **Natural Products Reports**, p. 211 – 223, 2003.

EGOROV, A. M; ULYASHOVA, M; RUBTSOVA, M. Y. Bacterial Enzymes and Antibiotic Resistance. **Acta Naturae**, v. 10, n. 4, p. 33 – 48, 2018.

FAHED, L; KHOURY, M., STIEN, D., OUAINI, N., EPARVIER, V. E EL BEYROUTHY, M. Essential oils composition and antimicrobial activity of six conifers harvested in Lebanon. **Chemistry Biodiversity**, v. 14, 2017.

FAUVART, M; DE GROOTE, V. N. MICHIELS, J. Role of persister cells in chronic infections clinical relevance and perspectives on anti-persister therapies. **Journal of Medical Microbiology**, v. 60, p. 699 – 709, 2011.

FESSENDEN, R. J; FESSENDEN, J. S. Organic Chemistry. **Willard Grand press**. Boston. Mass, 1982.

FREIBURGHHAUS, F; KAMINSKY, R; NKUNYA, M. H; BRUN, R. Evaluation of African medicinal plants for their in vitro trypanocidal activity. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 55, n. 1, p. 1 – 11, 1996.

FU, Z. X. C; CHONG, J. W. K. Z. Z. Biofilm and role of *icaA*, *icaD*, and accumulation-associated protein in *Staphylococcus epidermidis* isolated in breast

surgery. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 28, n. 2, p. 244 – 249, 2014.

FUURSTED, K; SCHØLER, L; HANSEN, F; DAM, K; BOJER, M. S; HAMMERUM, A. M; DAGNÆS-HANSEN, F; OLSEN, A; JASEMIAN, Y; STRUVE, C. Virulence of a *Klebsiella pneumoniae* strain carrying the New Delhi metallo-beta-lactamase-1 (NDM-1). **Microbes and Infection**, v. 14, p. 155 – 158, 2012.

FUX, C. A; COSTERTON, J. W; STEWART, P. S; STOODLEY, Survival strategies of infectious biofilms. **Trends of Microbiology**, v. 13, p. 34 – 40, 2005.

GADZIKOWSKA, M; GRYNKIEWICZ, G. Tropane alkaloids in pharmaceutical and phytochemical analysis. **Acta Poloniae Pharmaceutica**, v. 58, p. 481 – 492.

GHORBANI, A., AND ESMAEILIZADEH, M. Pharmacological properties of *Salvia officinalis* and its components. **Journal Traditional Complementary Medicine**, v. 7, p. 433 – 440, 2017.

GHOSHAL, S.; KRISHMA, B. N.; LAKSHMI, V. Antiamoebic activity of *Piper longus* fruits against *Entamoeba histolytica* in vitro and in vivo. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 50, p.167 - 170, 1996.

GIANG, P. M; OTSUKA, H. Natural Products Chemistry of Global Tropical and Subtropical Plants New Compounds and Potential Candidates for Drug Discovery from Medicinal Plants of Vietnam. **Journal Stage** v. 66, n. 5, p. 493 – 505, 2018.

GOMIDES, M. D. A; FONTES, A. M. S; MACEDO, C. F. C; VASCONCELOS, D. P; URZÉDO, J. E; SILVA, L. M; SADOYAMA, G. Bactérias gram-negativas resistentes a carbapenêmicos: Análise de 79 casos de uma unidade de terapia intensiva de adulto. **Enciclopédia Biosfera**, v. 10, n. 19, p. 150, 2014.

GONÇALVES, A. L. Estudo da atividade antimicrobiana de algumas árvores medicinais nativas com potencial de conservação/recuperação de florestas tropicais. São Paulo: Rio Claro, **Universidade Estadual Paulista** (tese de doutorado), 2007.

GRYNKIEWICZ, G; GADZIKOWSKA, M. Tropane alkaloids as medicinally useful natural products and their synthetic derivatives as new drugs. **Pharmacological Reports**, v. 60, n. 4, p. 439 – 463, 2008.

HEEB, S; FLETCHER, M. P; CHHABRA, S. R; DIGGLE, S. P; WILLIAMS, P; CÂMARA, M. Quinolones: from antibiotics to autoinducers. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 35, p. 247 – 274, 2011.

HENGZHUANG, W; WU, H; CIOFU, O. *In vivo* pharmacokinetics/ pharmacodynamics of colistin and imipenem in *Pseudomonas aeruginosa* biofilm infection. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 56, n. 5, p. 2683 – 2690, 2012.

_____. High beta-lactamase levels change the pharmacodynamics of beta-lactam antibiotics in *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 57, n. 1, p. 196 – 204, 2013.

HOFSTEENAGE, N; NIMWEGEN, E. V; SILANDER, O. K. Quantitative analysis of persister fractions suggests different mechanisms of formation among environmental isolates of *E. coli*. **BMC Microbiology**, v. 13, p. 25 - 35, 2013.

HØIBY, N. BJARNSHOLT, T; GIVSKOV, H; MOLIN, S; CIOFU, Ó. Antibiotic resistance of bacterial biofilms. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 35, n. 4, p. 322 – 332, 2010.

HØIBY, N; CIOFU, O; JOHANSEN, H. K; ZHI-JUN, S; MOSER, C; JENSEN, P. O; MOLIN, S. GIVSKOV, M; TOLKER-NIELSEN, T; BJARNSHOLT, T. The clinical impact of bacterial biofilms. **International Journal of Ora Medicine**, vv. 3, n. 2, p. 5 – 65, 2011.

JACKSON, D. W; SUZUKI, K; OAKFORD, L; SIMECKA, J. W; HART, M. E; ROMEO, T. Biofilm formation and dispersal under the influence of the global regulator CsrA of *Escherichia coli*. **Journal of Bacteriology**, v. 184, p. 290 – 301, 2002.

JAMAL, M; TASNEEM, U; HUSSAIN, T; ANDLEEN, S. Bacterial Biofilm: Its Composition, Formation and Role in Human Infections. **Research & Reviews: Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 4, n. 3, 2015.

JANSEN, K; KNIRSCH, C; ANDERSON, A. S. The role of vaccines in preventing bacterial antimicrobial resistance. **Nature Medicine**, v. 24, p. 10 – 19, 2018.

JASIM, H; HUSSEIN, A. O; HAMEED, I. H; KAREEM, M. A. Characterization of alkaloid constitution and evaluation of antimicrobial activity of *Solanum nigrum* using gas chromatography mass spectrometry (GC-MS). **Journal of Pharmacognosy and Phytotherapy**, v. 7, p. 56 – 72, 2015.

JIANG, X; HALL, A. B; ARTHUR, T. D; PLICHTA, D. R; COVINGTON, C. T; POYET, M. Invertible promoters mediate bacterial phase variation, antibiotic resistance, and host adaptation in the gut. **Science**, v. 363, n. 6423, p. 181 – 187, 2019.

JIJIE, R; BARRAS, A; TEODORESCU, F; BOUKHERROUB, R; SZUNERITS, S. Advancements on the molecular design of nanoantibiotics: current level of development and future challenges. **Molecular Systems Design & Engineering**, v. 2, p. 349 – 369, 2017.

KABIR, A. H; ROY, A. G; ALAM, M. F; ISLAM, R. Detection of quorum sensing signals in gram-negative bacteria by using reporter strain CV026. **Notulae Scientia Biologicae**, v. 2, p. 72 – 75, 2010.

KHALIL, A. "Antimicrobial activity of ethanol leaf extracts of *Catharanthus roseus* from Saudi Arabia," in **Second International Conference on Environment Science and Biotechnology**, v. 48, 2012.

KHAYAT, S; AL-ZAHRANI, S. H; BASUDAN, N; AL-ZAHRANI, N. H; SUBAHI, J. A. Chemical composition and in vitro antibacterial activities of traditional medicinal plant: *Olea sp.* **Biome Research**, v. 29, p. 1037 – 1047, 2018.

KIM, N. et al. Tropane and Granatane Alkaloid Biosynthesis: A Systematic Analysis. **Molecules**, v. 21, n. 1510, 2016.

KOHLBERG, Anke.et al. Regional trends in multidrug-resistant infections in German intensive care units: a real-time model for epidemiological monitoring and analysis. **Journal of Hospital Infection**, v. 73, p. 239 – 245, 2009.

KOHNEN-JOHANNSEN; K. L; KYSER, O. Tropane Alkaloids: Chemistry, Pharmacology, Biosynthesis and Production. **Molecules**, v. 24, n. 276, 2019.

KORUKLUOGLU, M; GULGOR, G. The correlation between biofilm formation and antibiotic resistance of some microorganisms isolated from "Kefir". **Journal of Biotechnology**, v. 231, p. S15, 2016.

KRISHNAN, T; YIN, W. F; CHAN, K. G. Inhibition of quorum sensing-controlled virulence factor production in *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 by Ayurveda spice clove (*Syzygium aromaticum*) bud extract. **Sensors (Basel)**, v. 12, p. 4016 - 4030, 2012.

KULAC, M; AKTAS, C; TULUBAS, F; UYGUR, R; KANTER, M; ERBOGA, M; CEBER, M; TOPCU, B; OZEN, O. A. The effects of topical treatment with curcumin on burn wound healing in rats. **Journal of Molecular Histology**, v. 44, n. 1, p. 83 – 90, 2013.

KUMAR, S; PANDEY, A. K. Phenolic content, reducing power and membrane protective activities of *Solanum xanthocarpum* root extracts. **Vegetos International Journal of Plant Research**, v. 26, p. 301 – 307, 2013.

KYIMACI, M. E. et al. Quorum sensing signals and related virulence inhibition of *Pseudomonas aeruginosa* by a potential probiotic strain's organic acid. **Microbial Pathogenesis**, v. 121, p. 190 – 197, 2018.

LE CHEVALLIER, M.W.; CAWTHON, C.D.; LEE, R.G. Factors promoting survival of bacteria in chlorinated water supplies. **Applied Environmental Microbiology**, v. 54, p. 649 – 654, 1988.

LI, X. H; LEE, J. H. Antibiofilm agents: a new perspective for antimicrobial strategy. **Journal of Microbiology**, v. 55, p. 753 – 766, 2017.

LIN, W. H; KAO, C. Y; YANG, D. C; TSENG, C. C; WU, A. B; TENG, C. H; WANG, M. C; WU, J. J. Características clínicas e microbiológicas de *Klebsiella pneumoniae* de infecções recorrentes do trato urinário adquiridas na

comunidade. **European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Disease**, v. 33, p. 1533 – 1539, 2014.

LORENZI, H. Árvores Brasileiras: manual de identificação cultivo de plantas arbóreas nativas do Brasil. **Amazon**, v. 1, 2008.

LU, L; HU, W; TIAN, Z; YUAN, D; YI, G; ZHOU, Y; CHENG, Q; ZHU, J; LI, M. Developing natural products as potential anti-biofilm agents. **Chinese Medicine**, v. 14, n. 11, 2019.

LULEKAL E, RONDEVALDOVA J, BERNASKOVA E, CEPKOVA J, ASFAW Z, KELBESSA E. Antimicrobial activity of traditional medicinal plants from Ankober District, North Shewa Zone, Amhara Region, Ethiopia. **Pharmaceutical Biology**, v. 52, n. 5, p. 614 –620, 2014.

MACEDO, A. J; ABRAHAM, W. R. Can infections biofilm be controlled by blocking bacterial communication? **Medicinal Chemistry**, v. 5, p. 517 – 528, 2009.

MADIGAN, M. T. et al. **Microbiologia de Brock**. 14 ed., Porto Alegre: Artmed, 2016.

MAH, T. F; O'TOOLE, G. A. Mechanisms of biofilm resistance to antimicrobial agents. **Trends Microbiology**, v. 9, p. 34 – 39, 2001.

MARTÍNEZ-SOLANO, L; MACIA, M. D; FAJARDO, A; OLIVER, A; MARTINEZ, J. L. Chronic *Pseudomonas aeruginosa* infection in chronic obstructive pulmonary disease. **Clinical Infections Diseases**, v. 47, n. 12, p. 1526 – 1533, 2008.

MATH, T. F. Biofilm-specific antibiotic resistance. **Future Microbiology**, v. 7, n. 9, p. 1061 – 1072, 2012.

MCCMAHON, D. K; ARMSTRONG, J. A; HUANG, X. L; RINALDO, C. R; GUPTA, P; WHITESIDE, T. L. A study of subcutaneous recombinant interleukin-2 in patients with advanced HIV disease while on zidovudine. **AIDS**, v. 8, p. 59 – 66, 1995.

MISHRA, A; KUMAR, S; BHARGAVA, A; SHARMA, B; PANDEY, A. K. Studies on in vitro antioxidant and anti staphylococcal activities of some important medicinal plants. **Cellular and Molecular Biology**, v. 57, p. 16 – 25, 2012.

MORAES, M. N; SILVEIRA, W. C; TEIXEIRA, L. E .M; ARAÚJO, I. D. Mechanisms of bacterial adhesion to biomaterials. **Revista de Medicina de Minas Gerais**, v. 23, n. 1, p. 99 – 104, 2013.

MOREIRA, C. A., et al. Biofilm production by clinical staphylococci strains from canine otitis. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 43, p. 371- 374, 2012.

MUNITA, J. J; ARIAS, C. A. Mechanisms of antibiotic resistance. **Microbiology Spectrum**, v. 4, n. 2, 2016.

NANGINO, G. O. et al. Financial impact nosocomial infections of the intensive care units of a charitable hospital in Minas Gerais, Brazil. **Revista Brasileira de Terapia Intensiva**, v. 24, n. 4, p. 357 – 361, 2012.

NASIRMOGHADAS, Pourya. et al. Evaluation of Biofilm Formation and Frequency of Multidrug-resistant and Extended Drug-resistant Strain in *Pseudomonas aeruginosa* Isolated from Burn Patients in Isfahan. **Advanced Biomedical Research**, v. 24, 2018.

NICOLOSI, D; CUPRI, S; GENOVESE, C; TEMPERA, G; MATTINA, R; PIGNATELLO, R. Nanotechnology approaches for antibacterial drug delivery: Preparation and microbiological evaluation of fusogenic liposomes carrying fusidic acid. **Int. Journal of Antimicrobial Agents**, v. 45, n. 6, p. 622–626, 2015.

NITHA, B; REMASHREE, A. B; BALACHANDRAN, I. Antibacterial activity of some selected indian medicinal plants. **International Journal Pharmaceutical Science Research**, v. 3, p. 2038 – 2042, 2012.

NIVEDITHA, S.; PRAMODHINI, S.; UMADEVI, S.; KUMAR, S.; STEPHEN, S. The isolation and the biofilm formation of uropathogens in the patients with catheter associated urinary tract infections (UTIs). **Journal of Clinical Diagnostic Research**, v. 6, p. 1478 – 1482, 2012.

OLIVEIRA, L. B.; VALLE, A. R. M. C; MAGALHÃES, R. L. B; ANDREADE, F. R; SOUSA, A. F. L; QUEIROZ, A. A. F. L. N. Prevalence of community infections diagnosed in the family health strategy. **Revista de Enfermagem**, v. 10, p. 325 – 332, 2016.

OMS. **Antimicrobial resistance: global report on surveillance**. World and Health Organization. 2012. Disponível em: <http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/112642/1/9789241564748_eng.pdf?ua=1>. Acesso em: 17, março, 2018.

OMS. **Global priority list of antibiotic-resistant bacteria to guide research, discovery, and development of new antibiotics**. 2017b. Disponível em: <<http://www.who.int/mediacentre/news/releases/2017/bacteria-antibiotics-needed/en/>>. Acesso em: 15, janeiro, 2019.

OMS. Organização Mundial da Saúde. 2017a. **Antimicrobial resistance**. Disponível em: <<http://www.who.int/antimicrobial-resistance/en/>>. Acesso em: 15, janeiro, 2019.

OMULOKOTI, E; KHAN, B; CHHABRA, S. C. Antispasmodic activity of four Kenyan medicinal plants. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 56, p. 133 - 137, 1997.

OTHMAN, L; SLEIMAN, A; ABDEL-MASSIH, R. M. Antimicrobial Activity of Polyphenols and Alkaloids in Middle Eastern Plants. **Frontiers in Microbiology**, v. 10, 2019.

PANDEY, A .K.; PANDEY, S; SHARMA, P; MAHESHWARI, D. K. Antibacterial potential of extracts of *Lantana camara*: A prominent weed of Northern India. **Universities Journal Phytochemistry Ayurvediv Heights**, v. 1, p. 18 – 23, 2005.

QIU, F; YANG, C; YUAN, L; XIANG, D. LAN, X; CHEN, M; LIAO, Z. Phenylpyruvic Acid Reductase Is Required for Biosynthesis of Tropane Alkaloids. **Organic Letters** v. 20, p. 7807 – 7810, 2018.

RAO, K. N; VENKATACHALAM, S. R. Inhibition of dihydrofolate reductase and cell growth activity by the phenanthroindolizidine alkaloids pergularinine and tylophorinidine: the in vitro cytotoxicity of these plant alkaloids and their potential as antimicrobial and anticancer agents. **Toxicology in Vitro**, v. 14, p. 53 – 59, 2000.

REID, G.; CHARBONNEAU-SMITH, R.; LAM, D.; KANG, Y.S.; LACERTE, M.; HAYES, K.C. Bacterial biofilm formation in the urinary bladder of spinal cord injured patients. **Paraplegia**, v. 30, p. 711 – 717, 1992.

RENNER, U, D; OERTEL, R; KIRCH, W. Pharmacokinetics and pharmacodynamics in clinical use of scopolamine. **Therapeutic Drug Monitoring**, v. 27, p. 655 – 665, 2005.

ROMO, A. L; QUIRÓS, R. Appropriate use of antibiotics: an unmet need. **Therapeutic advances in urology: SAGE Journals**, v. 11, p. 9 – 17, 2019.

SALAMA, H. M; MARRAIKI, N. Antimicrobial activity and phytochemical analyses of *Polygonum aviculare* L. (Polygonaceae), naturally growing in Egypt. **Saudi Journal of Biological Sciences**, v. 17, p. 57 – 63, 2010.

SAMUELSSON, G. Drugs Of Natural Origin by Gunnar Samuelsson. **Amazon**, 1992.

SANCHEZ, C. J., JR.; MENDE, K.; BECKIUS, M.L.; AKERS, K.S.; ROMANO, D.R.; WENKE, J.C.; MURRAY, C.K. Biofilm formation by clinical isolates and the implications in chronic infections. **BMC Infections and Diseases**, v. 29, p. 13 – 47, 2013.

SHARMA, D; MISBA, L; KHAN, A. D. Antibiotics versus biofilm: an emerging battleground in microbial communities. **Antimicrobial Resistance & Infection Control**, v. 8, n. 76, 2019.

SHER, H; AL-YEMENI, M. N; WIJAYA, L. Ethnobotanical and antibacterial potential of *Salvadora persica* L.: a well-known medicinal plant in Arab and Unani system of medicine. **Journal of Medicinal Plants Research**, v. 5, p. 1224 – 1122, 2011.

SHI, Jian et al. Efficacy of Combined Vancomycin and Fosfomycin against Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* in Biofilms *In Vivo*. **PLOS ONE**, v. 9, p. 1- 14, 2014.

SIMÕES, C. M. O. (Coord). **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 6 ed., Porto Alegre: editora da UFRGS; Florianópolis: Editora da UFSC, 2010.

SINGH J, KAMBOJ SS, BAKSHI MS, KHULLAR P, SINGH V, MAHAL A, DAVE PN, THAKUR S, KAUR G, KAMBOJ SS, BAKSHI MS. Bovine serum albumin bioconjugated gold nanoparticles: synthesis, hemolysis, and cytotoxicity toward cancer cell lines. **Journal of Physycal Chemical**, v. 116, p. 8834 – 8843, 2012.

SINGHAI, M.; MALIK, A.; SHAHID, M.; MALIK, M. A.; GOYAL, R. A study on device-related infections with special reference to biofilm production and antibiotic resistance. **Journal of Global Infectious Disease**, v. 4, p. 193 – 198, 2012.

SOUZA, V. C.; LORENZI, H. Botânica sistemática: guia ilustrado para identificação das famílias de fanerógamas nativas e exóticas no Brasil, baseado em APG II. 2ª ed., **Instituto Plantarum**, 2008.

STEPANOVIC, S; VUKOVIC, D; HOLA, V; BONAVENTURA, G; DEJUKIC, S; CIRKOVIC, I; RUZICKA, F. Quantification of biofilm in microtiter plates: overview of testing conditions and practical recommendations for assessment of biofilm production by staphylococci. **Journal of pathology, microbiology and immunology**, v. 115, n. 8, p. 891 – 899, 2007.

STERMITZ, F. R; LORENZ, P; TAWARA, J. N; ZENEWICZ, L. A; LEWIS, K. Synergy in a medicinal plant: Antimicrobial action of berberine potentiated by 5'-methoxyhydrnocarpin, a multidrug pump inhibitor. **Proceedings of the National Academy of Sciences, USA.**, v. 97, p. 1433 – 1437, 2000.

TAGRANTE, C. R; CECCON, M. E. J. R; FALCÃO, M. C; SETTI, M; SAKITA, N; VIEIRA, R. A. Prevalence of extended-spectrum beta-lactamase producing Gram-negative bacterial sepsis in a Neonatal Intensive Care Unit. **Revista Paulisa de Pediatria**, v. 26, n.1, p. 59 – 63, 2008.

TAHA, H. EL-BAHR, M. K. In vitro studies on Egyptian *Catharanthus roseus* (L.) G.Don. IV: Manipulation of Some Amino Acids as Precursors for Enhanced of Indole Alkaloids Production in Suspension Cultures. **Australian Journal of Basic and Applied Sciences**, v. 3, n. 4, p. 3137 - 3144, 2009.

TAYE B, GIDAY M, ANIMUT A, SEID J. Antibacterial activities of selected medicinal plants in traditional treatment of human wounds in Ethiopia. **Asian Pacific Journal Tropical Biomedicine**, v.1, n. 5, p. 370 – 375, 2011.

TOMINAGA, K., HIGUCHI, K., HAMASAKI, N., HAMAGUCHI, M., TAKASHIMA, T., TANIGAWA, T. *In vivo* action of novel alkyl methyl quinolone alkaloids against

Helicobacter pylori. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 50, p. 547 – 552, 2002.

VICHKANOVA, S. A; RUBINCHIK, M. A; ADGINA, V. V; FEDORCHENKO, T. S. Study of the chemotherapeutic effect of sanguinarine. **Farmakologiya i Toksikologiya**, v. 32, p. 325 – 328, 1969.

YANG, D.; ZHANG, Z. Biofilm-forming *Klebsiella pneumoniae* strains have greater likelihood of producing extended-spectrum beta-lactamases. **Journal of Hospital Infections**, v. 68, p. 369 – 371, 2008.

YAN-HUA, L; ZHOU, Y-H; REN, Y. Z; XU, C.-G; LIU, X; LIU, B; YANG, Y-B. Inhibition of *Streptococcus suis* Adhesion and Biofilm Formation in Vitro by Water Extracts of *Rhizoma Coptidis*. **Frontiers in Pharmacology**, v. 9, p. 371, 2018.

YU, S. et al. Biofilm inhibition and pathogenicity attenuation in bacteria by *Proteus mirabilis*. **Royal Society Open Science**, v. 5, n. 4, p. 170702, 2018.