

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

Vanessa Schopf Machado

**CARACTERIZAÇÃO, TOXICIDADE, ATIVIDADE
ANTIOXIDANTE, ANTIMICROBIANA E ANTIBIOFILME DO
ÓLEO ESSENCIAL E EXTRATO DE *Achyrocline flaccida***

Santa Maria, RS
2021

Vanessa Schopf Machado

**CARACTERIZAÇÃO, TOXICIDADE, ATIVIDADE
ANTIOXIDANTE, ANTIMICROBIANA E ANTIBIOFILME DO
ÓLEO ESSENCIAL E EXTRATO DE *Achyrocline flaccida***

Tese apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas: Análises Clínicas e Toxicológicas do Centro de Ciências da Saúde, da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM, RS), como requisito parcial para obtenção do título de **Doutor em Ciências Farmacêuticas: Análises Clínicas e Toxicológicas.**

Orientador: Roberto Christ Vianna Santos
Coorientadora: Michele Rorato Sagrillo

Santa Maria, RS
2021

Machado, Vanessa Schopf
CARACTERIZAÇÃO, TOXICIDADE, ATIVIDADE ANTIOXIDANTE,
ANTIMICROBIANA E ANTIBIOFILME DO ÓLEO ESSENCIAL E EXTRATO
DE *Achyrocline flaccida* / Vanessa Schopf Machado.- 2021.
116 p.; 30 cm

Orientador: Roberto Christ Vianna Santos
Coorientador: Michele Rorato Sagrillo
Tese (doutorado) - Universidade Federal de Santa
Maria, Centro de Ciências da Saúde, Programa de Pós
Graduação em Ciências da Saúde, RS, 2021

1. Plantas Medicinais 2. Microrganismos 3. Saúde I.
Vianna Santos, Roberto Christ II. Sagrillo, Michele
Rorato III. Título.

Sistema de geração automática de ficha catalográfica da UFSM. Dados fornecidos pelo autor(a). Sob supervisão da Direção da Divisão de Processos Técnicos da Biblioteca Central. Bibliotecária responsável Paula Schoenfeldt Patta CRB 10/1728.

Declaro, VANESSA SCHOPF MACHADO, para os devidos fins e sob as penas da lei, que a pesquisa constante neste trabalho de conclusão de curso (Tese) foi por mim elaborada e que as informações necessárias objeto de consulta em literatura e outras fontes estão devidamente referenciadas. Declaro, ainda, que este trabalho ou parte dele não foi apresentado anteriormente para obtenção de qualquer outro grau acadêmico, estando ciente de que a inveracidade da presente declaração poderá resultar na anulação da titulação pela Universidade, entre outras consequências legais.

Vanessa Schopf Machado

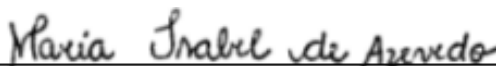
**CARACTERIZAÇÃO, TOXICIDADE, ATIVIDADE
ANTIOXIDANTE, ANTIMICROBIANA E ANTIBIOFILME DO
ÓLEO ESSENCIAL E EXTRATO DE *Achyrocline flaccida***

Tese apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas: Análises Clínicas e Toxicológicas do Centro de Ciências da Saúde, da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM, RS), como requisito parcial para obtenção do título de **Doutor em Ciências Farmacêuticas: Análises Clínicas e Toxicológicas**.

Aprovado em 30 de setembro de 2021:



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



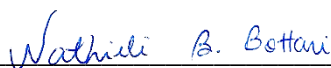
Maria Isabel de Azevedo, Dra. (UFMG)



Aleksandro Schafer da Silva, Dr. (UDESC)



Liliane de Freitas Bauermann, Dra. (UFSM)



Nathieli Bianchin Bottari, Dra. (UFN)

Santa Maria, RS
2021

AGRADECIMENTOS

Primeiramente, quero agradecer a **Deus** e as **Santinhas**, por nunca me deixarem desistir e por todos os dias sussurrarem em meus ouvidos “Você é capaz!”.

Mãe e Pai vocês moram no meu coração, pensar em vocês me faz capaz de seguir em frente e querer a cada dia ser uma pessoa melhor, enfrentar meus medos sem pensar em desistir nos momentos difíceis. Vocês são pessoas abençoadas só tenho a agradecer e dizer que se cheguei até aqui foi por que tive vocês como exemplo de vida.

Deus, com sua infinita bondade colocou em minha vida uma pessoa que faz toda diferença e que em todos esses 6 anos e vários dias de convivência me ajudou a superar todos os obstáculos necessários para o meu crescimento. Meu amor, **Carlos Rafael**, você é muito especial para mim, não tenho palavras para agradecer tanto carinho, amor, paciência, companheirismo, obrigada pelos ensinamentos e por toda ajuda em todos os momentos. Agradeço por todo apoio e carinho da minha sogra **Solange**, sogro **José Carlos, Jéssica e Toni**.

A batalha chamada doutorado só foi possível pelo teu aceite professor **Roberto Christ Vianna Santos**, obrigada pelos ensinamentos e principalmente pela oportunidade de aprender a Microbiologia.

Nesse caminho várias amizades surgiram e ficaram marcadas em meu coração para o resto da vida. Professor **Paulo Peres**, obrigada pelo carinho e ensinamento desde o início do doutorado.

Querida amiguinha **Camila Verdi**, obrigada por todo carinho e companheirismo dos vários experimentos e provações do doutorado. Você foi muito importante para meu crescimento.

Cris, Vitinho, Fabi, Thais, Tici, Dani, agradeço todos os dias pela nossa amizade e companheirismo em todos os momentos do doutorado se vocês não existissem nada seria possível e esse caminho teria sido bem mais turbulento.

Sabrina Somacal te agradeço muito por toda ajuda e carinho que teve comigo nesse tempo. Você me ajudou e me orientou muito na parte prática e na escrita dos artigos. Muito obrigada por ter paciência e me dar esperanças quanto as publicações.

E por fim, agradeço a todos colegas, amigos e familiares que não citei nomes meu enorme carinho e agradecimento, pois de uma maneira ou outra me ajudaram a subir mais um degrau.

Agradeço a Universidade Federal de Santa Maria ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas: Análises Clínicas e Toxicológica e aos órgãos de fomento pela oportunidade.

*“Tudo que é seu encontrará uma
maneira de chegar até você”*

(Chico Xavier)

RESUMO

CARACTERIZAÇÃO, TOXICIDADE, ATIVIDADE ANTIOXIDANTE, ANTIMICROBIANA E ANTIBIOFILME DO ÓLEO ESSENCIAL E EXTRATO DE *Achyrocline flaccida*

AUTOR: Vanessa Schopf Machado
ORIENTADOR: Roberto Christ Vianna Santos
COORIENTADORA: Michele Rorato Sagrillo

As plantas medicinais representam uma importante fonte de novas moléculas com diversos benefícios e/ou aplicações para a saúde humana. Mesmo com o avanço das tecnologias as plantas continuam sendo a melhor opção para a descoberta de compostos com potencial atividade antioxidante, anti-inflamatória e antimicrobiana. Esse fato, é de extrema importância sabendo da evolução dos microrganismos e sua resistência a terapia antimicrobiana existente. Nesse contexto, essa tese teve como objetivo pesquisar a planta *Achyrocline flaccida* conhecida como “marcela ou macela”, sabendo do seu amplo uso medicinal na América do Sul. Sabendo das poucas pesquisas existentes com essa espécie buscamos entender em um primeiro momento a composição química tanto do óleo essencial como do extrato aquoso. Realizamos testes de toxicidade *in vitro* e *in vivo*. Além disso, analisamos a atividade antioxidante, antimicrobiana frente a *Mycobacterium malissiensis*, *M. abscessus*; *M. fortuitum*, *Pythium insidiosum* e *Aeromonas hydrophila*, além de avaliar o efeito antibiofilme. A caracterização do óleo essencial foi realizada por cromatografia gasosa de alta eficiência e o extrato foi caracterizado por cromatografia líquida de alta eficiência. Os compostos majoritários do óleo essencial foram α -pineno (41,10%) e cariofileno (30,52%), já para o extrato, componentes majoritários foram 3-O-metilquercetina (22,50%), quercetina (18%), e luteolina (12%). Tanto o óleo essencial como o extrato não apresentaram toxicidade nos testes *in vitro* e *in vivo* nas concentrações testadas. Os efeitos na redução das espécies reativas de oxigênio foram promissores para os dois compostos. Foi observado que o óleo e o extrato são capazes de reduzir as espécies reativas de oxigênio a níveis basais e também são capazes de reverter a ação do juglone (pro-oxidante). O óleo essencial apresentou efeito bacteriostático frente as micobactérias em concentrações que variaram de 1500 a 3000 $\mu\text{g mL}^{-1}$. No entanto, o extrato foi mais efetivo apresentando efeitos bacteriostático e bactericida em concentrações que variaram de 1560 e 3000 $\mu\text{g mL}^{-1}$. Sabendo da boa atividade antimicrobiana do extrato, foi analisada sua ação antibacteriana e antibiofilme frente a *A. hydrophila*. Mais uma vez o extrato mostrou-se efetivo causando a inibição e morte desse microrganismo na concentração de 5000 $\mu\text{g mL}^{-1}$ e também foi capaz de causar a inibição na formação do biofilme. Ademais, foi verificado o efeito anti-*Pythium insidiosum* do extrato. Como resultado o extrato foi ativo promovendo a inibição e morte desse oomiceto, em concentrações que variaram de 97 a 1562 $\mu\text{g mL}^{-1}$. Os bons resultados encontrados, nos encorajam na busca por explicações sobre os mecanismos de ação do óleo essencial e extrato aquoso de *A. flaccida*, com o intuito de desenvolver futuramente um possível medicamento fitoterápico de uso tópico e/ou sistêmico para tratar diversas complicações provocadas por esses microrganismos.

Palavras chave: Plantas medicinais. Microrganismos. Compostos fenólicos. *Pythium insidiosum*. *Aeromonas hydrophila*. *Mycobacterium*.

ABSTRACT

CHARACTERIZATION, TOXICITY, ANTIOXIDANT ACTIVITY, ANTIMICROBIAL AND ANIBIOFILM OF THE ESSENTIAL OIL AND AQUEOUS EXTRACT OF *Achyrocline flaccida*

AUTOR: Vanessa Schopf Machado
ORIENTADOR: Roberto Christ Vianna Santos
COORIENTADORA: Michele Rorato Sagrillo

Medicinal plants represent an important source of new molecules with diverse benefits and/or applications for human health. Even with the advancement of technologies, plants continue to be the best option for discovering compounds with potential antioxidant, anti-inflammatory and antimicrobial activity. This fact is extremely important knowing the evolution of microorganisms and their resistance to existing antimicrobial therapy. In this context, this study aimed to research the plant *Achyrocline flaccida* know as “marcela ou macela”, knowing its wide medicinal use in South America. Knowing the few existing researches with this species, we sought to understand at first the chemical composition of both the essential oil and the aqueous extract. We performed *in vitro* and *in vivo* toxicity tests. In addition, we analyzed the antioxidant activity, and antimicrobial activity against *Mycobacterium massiliensis*, *M. abscessus*, *M. fortuitum*, *Pythium insidiosum* and *Aeromonas hydrophila*, in addition to evaluating the antibiofilm effect. The characterization of the essential oil was performed by high-performance gas chromatography and the extract was characterized by high-performance liquid chromatography. The major compounds of essential oil were α -pinene (41.10%) and caryophyllene (30.52%), while for the extract, the major components were 3-*O*-methylquercetin (22.50%), quercetin (18%), and luteolin (12%). Both the essential oil and the extract did not show toxicity *in vitro* and *in vivo* tests at the concentrations tested. The effects in reducing reactive oxygen species were promising for both compounds. It was observed that the oil and extract are able to reduce reactive oxygen species to basal levels and are also able to reverse the action of juglone (pro-oxidant). The essential oil showed bacteriostatic effect against mycobacteria at concentrations ranging from 1500 to 3000 $\mu\text{g mL}^{-1}$. However, the extract was more effective, presenting bacteriostatic and bactericidal effects at concentrations ranging from 1560 to 3000 $\mu\text{g mL}^{-1}$. Perceptive the good antimycobacterial activity of the extract, its antibacterial and antibiofilm action against *A. hydrophila* was analyzed. Once again, the extract proved to be effective in inhibiting and killing this microorganism at a concentration of 5000 $\mu\text{g mL}^{-1}$ and was also able to inhibit biofilm formation. Furthermore, the anti-*Pythium insidiosum* effect of the extract was verified. The extract was active promoting the inhibition and death of this oomycete, at concentrations ranging from 97 to 1562 $\mu\text{g mL}^{-1}$. The good results found encourage us in the search for explanations about the action mechanisms of the essential oil and aqueous extract of *A. flaccida*, with the aim of developing in the future a possible herbal medicine for topical and/or systemic use to treat various complications caused by these microorganisms.

Keywords: Medicinal plants. Microorganisms. Compounds phenolic. *Pythium insidiosum*. *Aeromonas hydrophila*. *Mycobacterium*.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

- Figure 1:** *Achyrocline flaccida* foto feita pelo autor no município de Jaguari-RS e desenho mostrando as características morfológicas e estruturais da planta *A. flaccida*.....20
- Figura 2:** Método de hidrodestilação para obtenção do óleo essencial de *Achyrocline flaccida*.....25
- Figura3:** Etapas da formação de biofilme bacteriano.....33

LISTA DE TABELAS

REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

Tabela 1: Pesquisas científicas publicadas com a planta <i>A. flaccida</i>	21
Tabela 2: Etapas e atribuições da matriz de exopolissacarídeos na formação do biofilme.....	31

LISTA DE FIGURAS

COMUNICAÇÃO CURTA I

Figure 1: Essential oil of *A. flaccida* with 24 h incubation in the comet assay. Data were expressed as mean \pm standard deviation (SD). Analyzes were performed by one-way-ANOVA followed by Dunnett's Multiple Comparison test. Values with $p < 0.05$ were considered statistically significant. Being * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ and **** $p < 0.0001$. Positive control (hydrogen peroxide - PC); Negative control (NC) and Polysorbate 80 (P 80).....50

Figure 2: Effect of essential oil of *A. flaccida* on ROS production in *C. elegans*. N2 wild-type pre-treated with different concentrations of essential oil for 1h at 1-day-old was exposed to the presence or absence of Juglone for 1h. The data are expressed as percent of control. * and # represents difference from basal and juglone control groups, respectively. Two-way ANOVA followed by Dunnett Multiple Comparison Test. The experiment was performed five times. Polysorbate 80 (P 80).....50

COMUNICAÇÃO CURTA II

Figure S1: Representative chromatogram of the phenolic compounds in the *A. flaccida* aqueous extract. The chromatogram was acquired at 360 nm. Peak 1: quercetin; peak 2: luteolin; peak 3: unidentified; peak 4: 3-*O*-methylquercetin; peak 5: unidentified; peak 6: apigenin; peak 7: hispidulin; peak 8: isorhamnetin; peak 9: unidentified; peak 10: non-identified; peak 11: 3',7-dimethylquercetin; peak 12: taxifolin; 13 peak: 2',4',4-trihydroxy-6-methoxychalcone; 14 Peak: unidentified; 15 peak: unidentified quercetin derivative; 16 peak: unidentified.....63

Figure S2: *In vitro* (A) and *in vivo* (B) toxicity evaluation of *A. flaccida* aqueous extract in PBMCs and *C. elegans*, respectively. A) Data were expressed as mean \pm standard deviation (SD). Positive control (PC; hydrogen peroxide); negative control (NC) B). The data are expressed as means \pm SEM of three independent experiments ($n = 3$) normalized to % of live worms. * represents a statistical difference ($p < 0.05$) from the positive control (% of survival).....64

Figure S3: Effects of *A. flaccida* aqueous extract on ROS production *in vivo* (*C. elegans*). Wild-type strains (N2) were pre-treated with different concentrations of aqueous extract for 1 h. One-day-old strains were exposed to the presence or absence (basal) of juglone for 1 h. The data are expressed as a percent of control. * and # represent statistical differences ($p < 0.05$) from the basal and juglone control groups, respectively. The experiment was performed in triplicate.....65

MANUSCRITO I

Figure 1: *Pythium insidiosum* ultrastructure (CBS 119455) visualized by SEM. A) Control. *Pythium insidiosum* hyphae with turgid appearance showing a smooth and regular surface. B) *Pythium insidiosum* hyphae treated with [24 $\mu\text{g mL}^{-1}$] *A. flaccida* aqueous extract with appearance showing a rough surface and retracted and brittle aspect of the hyphae. Magnitude: A and B x700.....76

MANUSCRITO II

Figure 1 – Quantification of *A. hydrophila* biofilm formed in polyethylene plates by the colony counting (A) and crystal violet method (B) in different times. Was used analysis of variance two-way ANOVA followed by Tukey’s test considering as statistically significant a $p\text{-value} \leq 0.05$. Data was expressed as the mean \pm standard deviation. Each point in the curve represents the mean of three independent experiments.....84

Figure 2 – Effect on inhibition (A) and destruction (B) of *A. hydrophila* biofilm by *A. flaccida* aqueous extract. Was used analysis of variance one-way ANOVA followed by Dunnet’s multiple comparisons test considering values $p < 0.0001$ (****) $p < 0.001$ (***) statistically significant compared with positive control. Data expressed on mean \pm standard deviation. Each point in the curve represents the mean of three independent experiments.....86

Figure 3 – Atomic force microscopy (AFM) representative images of biofilm formed by *A. hydrophila* in the presence of different concentrations of *A. flaccida* aqueous extract. Biofilm inhibition effects were evaluated in 24 h and destruction of biofilm formed was evaluated in 48 h. The concentration of *A. flaccida* aqueous extract evaluated for inhibition were 1250 µg/mL (A) and 2500 µg/mL (B); and for destruction were 2500 µg/mL (D) and 5000 µg/mL (E). Positive control (C) and positive control (F) in polyethylene plate in time of 24 h and 48 h, respectively.....87

LISTA DE TABELAS

COMUNICAÇÃO CURTA I

Table 1: Chemical composition of the essential oil of <i>A. flaccida</i>	49
---	----

COMUNICAÇÃO CURTA II

Table S1: Tentative identification and quantification of phenolic compounds in the <i>A. flaccida</i> aqueous extract.....	62
---	----

MANUSCRITO I

Table 1. <i>In vitro</i> susceptibility ($\mu\text{g mL}^{-1}$) of <i>A. flaccida</i> aqueous extract against <i>P. insidiosum</i> isolates (n=19).....	74
--	----

Table 2. <i>In vitro</i> activity of <i>A. flaccida</i> aqueous extract against <i>P. insidiosum</i> isolates (n=19).....	75
--	----

ANEXOS

ANEXO A - Sistema Nacional de Gestão de Patrimônio Genético e do Conhecimento Tradicional Associado.....	112
ANEXO B - Carta de aprovação pelo Comitê de Ética da Universidade Franciscana para uso de células polimorfonucleares de sangue periférico.....	113
ANEXO C - Comprovante de envio manuscrito III para a revista <i>Mycopathologia</i>	114
ANEXO D - Autorização revista <i>Natural Product Research</i> (Short Communication I).....	115
ANEXO E - Autorização revista <i>Natural Product Research</i> (Short Communication II).....	116

SUMÁRIO

	APRESENTAÇÃO	
1	INTRODUÇÃO.....	17
2	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	19
2.1	PLANTAS MEDICINAIS	19
2.2	FAMÍLIA ASTERACEAE – <i>Achyrocline flaccida</i>	19
2.3	PROCESSOS DE EXTRAÇÃO	23
2.3.1	Óleos Essenciais	23
2.3.2	Extratos de Plantas.....	24
2.4	MICROORGANISMOS.....	25
2.4.1	<i>Aeromonas hydrophila</i>.....	25
2.4.2	<i>Micobactérias</i>.....	26
2.4.3	<i>Pythium insidiosum</i>.....	28
2.5	MECANISMO DE RESISTÊNCIA BACTERIANO.....	30
2.6	BIOFILME DE <i>Aeromonas hydrophila</i> – Inibição e Erradicação.....	31
2.7	ATIVIDADE ANTIOXIDANTE.....	36
3	OBJETIVOS.....	37
3.1	OBJETIVO GERAL.....	37
3.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	37
4	ARTIGOS CIENTÍFICOS	38
4.1	COMUNICAÇÃO CURTA I.....	38
4.2	COMUNICAÇÃO CURTA II.....	51
5	MANUSCRITOS.....	66
5.1	MANUSCRITO I.....	66
5.2	MANUSCRITO II.....	77
6	DISCUSSÃO GERAL.....	92
7	CONCLUSÃO.....	96
8	PERSPECTIVAS.....	98
9	REFERÊNCIAS	99
	ANEXOS.....	112
	ANEXO A.....	112
	ANEXO B.....	113
	ANEXO C.....	114
	ANEXO D.....	115
	ANEXO E.....	116

APRESENTAÇÃO

Esta tese está estruturada em **Introdução, Revisão Bibliográfica, Objetivos, Artigos Científicos I e II, Manuscrito I e II além de Discussão Geral, Conclusões, Referências e Anexos.** A seção **Introdução** inclui uma breve apresentação sobre a planta, métodos utilizados e efeitos biológicos dos compostos naturais. Na seção **Revisão Bibliográfica** os conceitos sobre plantas medicinais pertencentes à família Asteraceae com especial atenção para *A. flaccida*, métodos de obtenção de óleos essenciais e extratos, resistência microbiana e microrganismos patogênicos para humanos. Os artigos científicos I e II foram anexados conforme normas da revista *Natural Product Research*. O **Manuscrito I** foi submetido para a revista *Natural Product Research*. O **Manuscrito II** está em fase final da escrita. A seção **Referências** contempla as citações dos tópicos Introdução, Revisão Bibliográfica e Discussão Geral. Na seção **Anexos** encontram-se a certidão de registro de patrimônio genético da *A. flaccida*, a aprovação do comitê de ética da Universidade Franciscana para uso de células mononucleares de sangue humano e print dos e-mails com as autorizações da revista *Natural Product Research* para uso dos artigos publicados apenas na versão impressa desta tese.

1 INTRODUÇÃO

As espécies de *Achyrocline* são conhecidas popularmente pelo nome de “macela” ou “marcela”, e estão distribuídas em maior parte na América do Sul com cerca de 40 espécies. Dentre as espécies da família Asteraceae a *Achyrocline flaccida* (Weinm.) DC. é frequentemente encontrada e coletada no sul do Brasil (DEBLE et al. 2007), e está intimamente ligada a cultura popular brasileira, sendo utilizada para diversos fins terapêuticos como emenagogo, anti-helmíntico, tônico, excitante e antiespasmódico (HIERONYMUS, 1882; PARODI, 1886; PACCARD, 1905). Apesar de sua ampla utilização e importância, existem poucos estudos sobre essa espécie. Nesse contexto, com as novas tendências globais de preocupação com a biodiversidade e, ideais de desenvolvimento sustentável a utilização de plantas medicinais, têm sido ao longo dos anos uma das principais linhas de pesquisa para descoberta de novas moléculas com ação terapêutica (HORINOUCI, et al., 2013; XU, et al., 2014; PINTO, et al., 2015; PIANA, et al., 2016).

Óleos essenciais e extratos de plantas são misturas complexas de diferentes compostos bioativos que podem atuar de forma sinérgica ou antagônicas para determinados efeitos biológicos (COLPO et al. 2016). De fato, estudos demonstram que a quercetina é capaz de potencializar os efeitos citotóxicos de vários medicamentos quimioterápicos, melhorando a eficácia contra células tumorais (SAK, 2012; WANG et al. 2012). No entanto, a fórmula estrutural da quercetina possui elementos capazes de lhe conferir propriedades pró-oxidantes e antioxidantes (RIETJENS et al. 2005; HARWOOD et al. 2007). A ação antioxidante ou sequestradora de radicais livres de produtos naturais tem recebido atenção especial, uma vez que, as espécies reativas de oxigênio (ERO) estão implicadas na patologia de mais de 100 doenças humanas (HALLIWELL, 2001).

Além dos efeitos antioxidantes, os óleos essenciais e extratos de plantas possuem largo espectro de ação contra fungos, bactérias, parasitos e insetos, além de apresentarem baixa toxicidade e baixo custo (BATISH et al. 2008). Plantas da família Asteraceae são muito estudadas, pois apresentam em sua composição química compostos fenólicos, terpenóides e óleos essenciais com potenciais efeitos biológicos (antitumoral, anti-inflamatória, antioxidante e antimicrobiana) (LÓPEZ, 2006; RAVEN et al. 2007). A composição química do extrato de inflorescências de *A. satureioides* demonstra a presença de importantes compostos fenólicos, como isoquercitrina, quercetina e ácido caféico (RETTA et al. 2012; SABINI et al. 2013).

Os microrganismos por mecanismos específicos evoluíram e se tornaram resistentes aos fármacos antimicrobianos causando vários problemas para a saúde pública mundial (WOO-

LHOUSE, FARRAR, 2014). Muitos microrganismos encontrados no meio ambiente contaminando água, solo e o ar podem causar doenças que, se não tratadas evoluem para a morte. Existe uma previsão para o ano de 2050 alertando que infecções causadas por bactérias resistentes a antibacterianos serão a principal causa de morte (MENDELSON 2015). Pacientes com anormalidades pulmonares e imunossupressão estão mais propensos a desenvolver doença pulmonar causada por bactérias de crescimento rápido como por exemplo, *Mycobacterium fortuitum*, *Mycobacterium abscessus*, dentre outras (WEISS e GLASSROTH, 2012). Conhecendo os mecanismos de resistência desses microrganismos é mais fácil conduzir pesquisas na busca de compostos mais eficazes e sem efeitos colaterais utilizando compostos proveniente da nossa diversificada flora vegetal que são utilizados na cultura popular por milênios.

Diante do potencial uso popular como antiespasmódico, antipirético, emenagogo das espécies de *Achyrocline*, é importante desenvolver estudos que possam investigar e confirmar cientificamente as propriedades terapêuticas desta planta e em um futuro próximo promover seu possível uso como medicamento fitoterápico para o tratamento de diversas complicações causadas por diferentes microrganismos.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 PLANTAS MEDICINAIS

O uso de plantas para tratamento de enfermidades é muito antigo. Papiros egípcios de 1.600 a.C. listam muitos medicamentos feitos a partir de plantas, animais e minerais, sendo que as plantas destaque da época foram: funcho (*Foeniculum vulgare* Miller), coentro (*Coriandrum sativum* L.), gengiana (*Genciana lutea* L.), zimbro (*Juniperus cummunis* L.), tomilho (*Thymus vulgare* L.) dentre outras. No ano 377- 460 a.C. Hipócrates considerado o pai da medicina estudou as reações individuais de cada paciente a uma determinada doença e assim personalizou o tratamento para cada indivíduo, com doses unitárias, repouso e preparações de plantas. No ano de 40-90 d.C. outro grande especialista grego chamado Dióscorides escreveu “De Matéria Médica”, que listava, descrevia e ilustrava mais de 600 plantas, com especial destaque ao relato de uso do salgueiro branco de nome científico *Salix alba* L., fonte mais antiga de salicina utilizada para analgesia. No ano de 129-200 d.C. Galeno estudou e desenvolveu misturas complexas chamadas de fórmulas galênicas e com o passar dos anos outros pesquisadores foram surgiram e outras doutrinas foram criadas como a homeopatia e a fitoterapia.

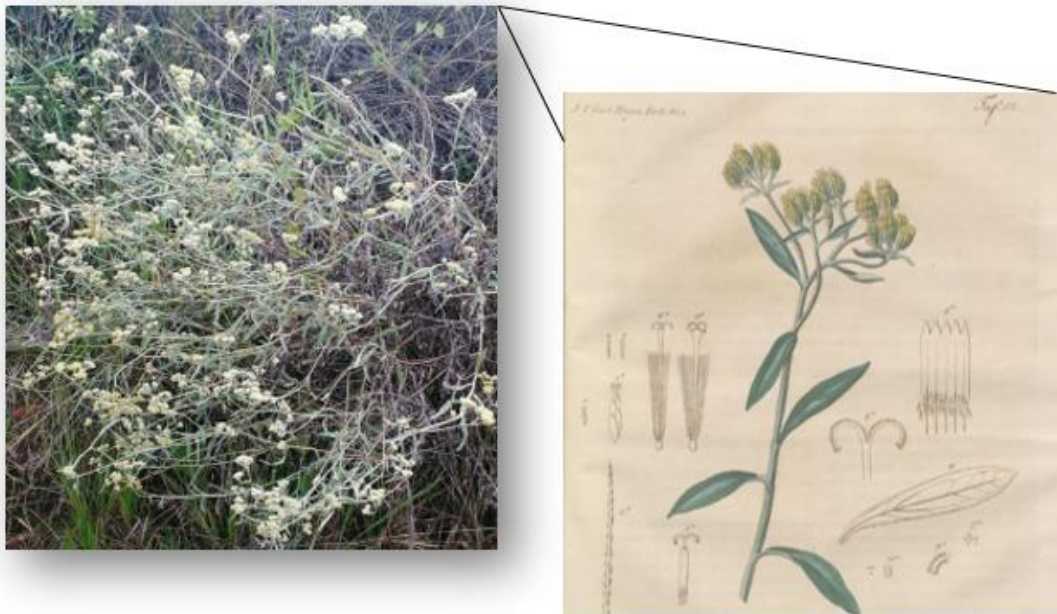
Com a chegada da industrialização e crescentes avanços na descoberta e produção de medicamentos sintéticos, o uso da medicina tradicional foi perdendo força (LORENZI; MATOS, 2002). No entanto, no século XXI, as novas tendências globais de preocupação com a biodiversidade e os ideais de desenvolvimento sustentável trouxeram investimentos aos estudos com plantas medicinais resgatando a sabedoria popular e o uso terapêutico de plantas (GOMES e GOMES, 2000). Em 2006, foi aprovada a Política Nacional de Práticas Integrativas e Complementares no Sistema Único de Saúde (SUS) e a Política Nacional de Plantas Mediciniais e Fitoterápicos destinadas a promoção do uso seguro e racional de plantas medicinais, uso sustentável da biodiversidade, desenvolvimento da cadeia produtiva e da indústria nacional (CARVALHO et al. 2007). O Brasil é o país com a maior biodiversidade de plantas do mundo, com cerca de aproximadamente 55.000 espécies catalogadas (GUERRA; NODARI, 2001). Dentre essas espécies muitas já foram estudadas sobre os diversos efeitos biológicos, apresentando ação antioxidante, anti-inflamatória, antimicrobiana, antibiofilme dentre outras.

2.2 FAMÍLIA ASTERACEAE – *A. flaccida*

Achyrocline flaccida pertence à família Asteraceae, gênero *Achyrocline* apresenta ampla distribuição geográfica, ocorrendo desde a Venezuela, Colômbia, Bolívia (BADILLO e GONZÁLEZ SANCHES, 1999), até a metade norte da Argentina (CABRERA, 1987; GIANGUA-

LANI, 1979) e Uruguai (GIANGUALANI, 1976). A região sul do Brasil, compreendendo Paraná, Santa Catarina e Rio Grande do Sul, possui uma população relativamente densa e diversificada das espécies de Asteraceae (DEBLE, 2007). *A. flaccida* apresenta caules herbáceos de 80-150 cm de altura, folhas alternadas lineares, apenas com nervuras centrais evidentes, suavemente descolores com capítulos numerosos. As inflorescências são dimórficas, amarelas ou amarelo-esverdeadas (Figura 1). A colheita das inflorescências é realizada nos meses de março e abril (DAVIES; VILLAMIL, 2004; RETTA, 2012).

Figura 1: *Achyrocline flaccida* foto feita pelo autor no município de Jaguari-RS e desenho mostrando as características morfológicas e estruturais da planta *A. flaccida*.



Fonte: Foto da esquerda de autoria pessoal. Desenho da direita retirada do site: <http://tropical.theferns.info/image.php?id=Achyrocline+flaccida>

Os membros dessa família são destaque devido seus efeitos adstringentes, antipiréticos, anti-inflamatórios, hepatoprotetor, diaforéticos em febres, relaxantes musculares suaves, laxantes dentre outros. Esses efeitos estão relacionados aos componentes altamente bioativos presente nessa família de plantas, tais como flavonóides, ácidos fenólicos, cumarinas, terpenóides (monoterpenos, sesquiterpenos, diterpenos e triterpenos) e esteróis (ACHIKA et al. 2014). Os poucos estudos existentes sobre *A. flaccida*, estão descritos na Tabela 1.

Tabela 1: Pesquisas científicas publicadas com *A. flaccida*.

Referência	Título Artigo	Resultados	Local Coleta
Hieronimus (1882)	Boletim da Academia Nacional de Ciências de Córdoba.	Tônico, excitante e com propriedades anti-helmínticas	Argentina
Parodi (1886)	Plantas típicas de Corrientes e Misiones no Paraguai	Antiespasmódico, antipirético	Argentina
Paccard (1905)	Plantas Medicinais da República Oriental e Argentina	Estimulante e emenagogo.	Argentina
Norbedo, Ferraro e Coussio (1982)	Uma nova Flavanona de <i>Achyrocline flaccida</i>	7,4' dihydroxy 5-methoxy flavanone 5-hidroxi-7-(3-metil-2,3-epoxibutoxi) flavanona	Argentina (Colonia Benítez, Província de Chaco)
Norbedo, Ferraro e Coussio (1984)	Flavonóides da <i>Achyrocline flaccida</i>	5-hidroxi-3,8-dimetóxi 7-(3-metil-2,3-epoxibutoxi) flavona 4'-hydroxy-5-methoxy-7-(3-methyl-2,3-epoxybutoxy) flavona	Argentina (Colonia Benítez, Província de Chaco)
Gutkind et al. (1984)	Atividade Antibacteriana da <i>Achyrocline flaccida</i>	Atividade antibacteriana (<i>Bacillus subtilis</i> , <i>Micrococcus luteus</i> e <i>Staphylococcus aureus</i>)	Argentina (Colonia Benítez, Província de Chaco)
Broussalis et al. (1988)	Constituintes fenólicos de quatro espécies de <i>Achyrocline</i>	Crisoeriol 4'-hidroxi,5-metoxi,7(3-methyl-2,3-epoxybutoxy) flavona Quercetin Quercetina 3-metil éter Tamarixetin Tamarixetina 7-glucósido	Colonia Benítez (<i>A. flaccida</i>) Concepción del Uruguay (<i>A. satureioides</i>) Córdoba (<i>A. tomentosa</i> e <i>a-lata</i>)

Continuação

		Galangin Galangina 3-metil é- ter Gnafaliina Isognafaliina 5,7,8-tri-hidroxi-3- metoxiflavona 5-hidroxi-3,8-dime- toxi-7(3-metil-2,3- epoxibutoxi)flavona roxy-7-(3-metil-2,3- epoxibutoxi)flava- nona 5-hidroxi-7- (3-metil-2,3-epoxi- butoxi)flavanona Naringenina-5-metil éter 4,2',4'-trihidroxi 6'- metoxichalcone Ácido caféico Ácido clorogénico ácido isoclorogé- nico Éster cafeico	
Retta et al. (2009)	Composição do óleo essencial de <i>Achyrocline flaccida</i> (Weinm.) DC. (Asteraceae) de diferentes localidades da Argentina	Identificados oitenta e três compostos representando mais de 90% dos óleos. Os principais componentes foram α -pineno e β -cariofileno.	San Ignacio - Província de Misiones; Goya, Puente de Santa Rosa - Província de Corrientes; San José – Província Misiones; San Javier – Província Misiones; Jardim América - Província de Misiones; Rota 14, entre Santo Tomé e Alvear Província de Corrientes; Vera – Província de Santa Fé; Loreto – Província de Corrientes
Rosa et al. 2017	Variabilidade e estrutura genética da população de <i>Achyrocline flaccida</i> (Weinm.) DC., uma espécie de alto valor na medicina popular na América do Sul	Variabilidade genética e estrutura de sete populações de <i>A. flaccida</i> do sul do Brasil.	Mata Atlântica no sul do Brasil nas seguintes regiões: Marialva (PR); Guarapuava (PR); Porto Barreiro (PR); Xanxerê (SC); Campos Novos (SC); Coxilhas (RS) e Panambi (RS).

2.3 PROCESSOS DE EXTRAÇÃO

2.3.1 Óleos Essenciais

Os óleos essenciais são conhecidos desde a antiguidade e constituem elementos voláteis, de baixo peso molecular e de natureza hidrofóbica originados do metabolismo secundário das plantas, contidos em muitos órgãos vegetais. Os óleos essenciais, estão relacionados com diversas funções necessárias à sobrevivência vegetal, exercendo papel fundamental na defesa contra microrganismos, por possuir propriedades antibacterianas e antifúngicas (CAVALEIRO, et al., 2006; GONÇALVES, et al., 2003; TEMPONE, et al., 2008). Os métodos de extração dos óleos essenciais comumente utilizados são a hidrodestilação ou a destilação por arraste a vapor (GUAN et al. 2007). No método da hidrodestilação o material vegetal é colocado em contato com a água e levado à ebulição, o vapor gerado arrasta consigo os compostos voláteis, que em seguida são recuperados por condensação. Na etapa final como o óleo é imiscível em água ele é obtido por decantação (Figura 2) (CUNHA et al. 2010; SEFIDKON et al. 2007).

Figura 2: Método de hidrodestilação para obtenção do óleo essencial de *Achyrocline flaccida*.



Fonte: Aatoria pessoal

Muitos óleos essenciais são utilizados para tratamento de complicações do trato gastrointestinal, sistema respiratório, como analgésico, antisséptico, antioxidante e antimicrobiano (CUNHA et al. 2010). O modo de ação dos derivados de plantas é diferente para cada composto bioativo e para cada microrganismo (LAHIRI et al. 2019). A utilização de óleos essenciais em associação com nanopartículas e antimicrobianos comercialmente disponíveis é uma alternativa promissora, podendo aumentar a atividade dos antimicrobianos e combater a formação de biofilmes (OMOJATE et al. 2014; ALGBURI et al. 2017).

Na indústria alimentícia os óleos essenciais são utilizados para aumentar o tempo de validade dos alimentos. Na indústria farmacêutica a aplicabilidade dos óleos está associada a preparações magistrais como adjuvante, corretivo do sabor e odor em medicamentos destinados à administração oral ou como aromatizante de formulações para uso externo. Outra área que vem ganhando destaque no uso de óleos essenciais é a agricultura, na qual se projeta o uso desses compostos como repelentes de insetos e inseticidas (TEIXEIRA et al. 2013; RAUL e KARUPPAYIL, 2014). No entanto, pouco se sabe sobre o óleo essencial de *A. flaccida*. Retta et al. (2009), avaliaram a composição do óleo essencial de *A. flaccida* de diferentes locais da Argentina, obtidos pelo processo hidrodestilação das inflorescências de *A. flaccida* (Weinm.) DC. onde o rendimento de óleo essencial foi de 0,1 - 0,8% (p/v) e a na análise GC-FID-MS identificou um total de 83 compostos, sendo o α -pineno (25,5 – 55,2%) e o β -cariofileno (12,2 – 30,7%) as substâncias majoritárias.

2.3.2 Extratos de Plantas

De acordo com a Cartilha de Plantas Medicinais e Medicamentos Fitoterápicos (2019), extratos são definidos como preparações de consistência líquida, sólida ou intermediária, obtida de matéria-prima vegetal, preparadas pelos métodos de extração denominados percolação, maceração ou outro método validado que utilize como solvente água, álcool ou outro solvente adequado. O método utilizado para a produção de um extrato procede de maneira bem diferente da utilizada para obtenção de óleos essenciais.

O processo de maceração é muito utilizado para a obtenção de compostos não voláteis e apresenta vantagens por ser um método de extração que não utiliza calor. O processo de maceração é simples e tradicionalmente mais utilizado e consiste do contato da substância vegetal com o líquido extrator por um determinado tempo. Muitos solventes podem ser utilizados nesse processo como o metanol, etanol, acetato de etila, bem como suas combinações com água (BI-ESAGA et al. 2011). Os extratos são constituídos por diferentes substâncias em concentrações desconhecidas que podem ter ação de forma isolada ou agir em sinergismo ou antagonismo com outras substâncias (GASPAR et al. 2017).

Muitos compostos bioativos derivados de plantas como flavonóides, taninos, antocianinas, ácidos fenólicos, cumarinas e lignana (SCALBERT et al. 1991), desempenham importante papel na resistência contra vários patógenos microbianos e protegem o organismo contra radicais livres e toxinas. Slobodníková et al (2016) relataram vários mecanismos antibacteriano dos compostos fenólicos (inibição do *Quorum sensing*). O modo de ação dos flavonóides está ligado

a danos na membrana citoplasmática (reduzindo a fluidez), inibição da síntese de ácidos nucléicos e metabolismo energético (LAHIRI et al. 2019). Já para os terpenóides, a ação antimicrobiana e antibiofilme dependem de compostos como cânfora, borneol, *p*-cimeno, α -pineno e β -pineno, onde o mecanismo de ação envolve propriedades anti-adesão celular dos terpenóides e ao aumento do cálcio ao longo da membrana (LAHIRI et al. 2019).

2.4 MICRORGANISMOS

Os microrganismos fazem parte da vida humana e, as bactérias, fungos são conhecidos ora por razões positivas ora por razões negativas. Muitos microrganismos atuam de forma benéfica sem causar complicações para a saúde, como os microrganismos utilizados na produção de antibióticos, alimentos, hormônios e outros compostos terapêuticos (BISEN et al. 2012). Entretanto, algumas características genéticas selecionadas e habilidades bioquímicas de alguns microrganismos os tornam perigosos tanto para indústrias (deterioração dos alimentos) quanto para a saúde humana (PRAKASH et al. 2007).

Os microrganismos podem ser encontrados contaminando superfícies inanimadas, equipamentos e materiais (sejam eles hospitalares ou não), além de serem encontrados com maior frequência nas mãos dos profissionais de saúde e pacientes (DEBNATH et al. 2018; SHAW et al. 2018). Quando ocorre a falha em uma das barreiras assépticas, chamamos de contaminação que subsequentemente pode evoluir para a formação do biofilme (MOUREAU; FLYNN, 2015). Patógenos frequentemente associados a doenças incluem *Campylobacter jejuni*, *Escherichia coli*, *Shigella* spp., *Vibrio cholerae*, *Aeromonas* spp. (RAMAMURTHY et al. 2014), *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Acinetobacter* spp., *Enterococcus*, *Mycobacterium* dentre outros (TOLERA et al. 2018).

2.4.1 *Aeromonas hydrophila*

O gênero *Aeromonas* pertence à família Aeromonadaceae, e apresenta mais de 30 espécies identificadas, sendo que as mais frequentemente isoladas com maior importância clínica são as espécies *Aeromonas hydrophila*, *Aeromonas caviae* e *Aeromonas veronii* (JANDA; ABBOTT, 2010; TAVARES et al. 2015). O gênero *Aeromonas* é constituído de bactérias Gram-negativas, ambos positivos para catalase e oxidase, anaeróbios facultativos com extremidades arredondadas que podem medir entre 1 a 3,5 μ m de diâmetro (MARTIN-CARNAHAN e JOSEPH, 2005). Esse gênero pode ser encontrado em vários ambientes aquáticos, no solo, nas fezes e são responsáveis por causar infecções intestinais e extra-intestinais em humanos e animais (PARKER e SHAW, 2011), que podem se contaminar através da ingestão de água ou

alimentos (JANDA; ABBOTT, 2010; OTTAVIANI et al. 2011). Outros estudos observaram a presença de isolados de *Aeromonas* em produtos cárneos, lácteos e legumes, com predominância de *A. hydrophila* (EL-DIEN et al. 2009; JANDA e ABBOTT, 2010).

A diversidade de complicações causada pelo gênero *Aeromonas* em diversas espécies animais e humanas, está relacionada a uma série de fatores de virulência, incluindo hemolisinas, aerolisinas, proteases, adesinas, invasinas, enterotoxinas, fosfolipases e lipases (ALPERI e FIGUERAS, 2010). Quando ocorre o processo de imunossupressão ocasionada pelo estresse ou outros fatores o organismo fica suscetível à infecção. Na aquicultura, as infecções causadas por bactérias oportunistas e patogênicas (*Aeromonas hydrophila* e *Citrobacter freundii*), são as principais responsáveis por causar injúrias e a morte de peixes, causando severos prejuízos econômicos e prejudiciais à saúde humana (BALDISSEROTTO e RADUNZ NETO, 2004; BAKER et al. 2013). As infecções causadas por *Aeromonas* sp. em seres humanos apresentam gravidade variável, evoluindo de uma comum gastroenterite para uma peritonite, colite e colangite. Quando a infecção ocorre por feridas pode desenvolver mionecrose, ectima gangrenoso podendo evoluir para bacteremia e sepse (tanto em indivíduos imunocomprometidos, quanto em imunocompetentes). A taxa de mortalidade para esses pacientes com condições predisponentes como cirrose hepática é de 67% (LEE et al. 2008). Em um estudo realizado por Rosso et al. (2019) relataram 21 casos de infecções hospitalares provocadas por *Aeromonas* sp. com maior prevalência da espécie *Aeromonas hydrophila* em pacientes hospitalizados com resistência fenotípica aos carbapenêmicos.

2.4.2 Micobactérias

As micobactérias pertencem ao gênero *Mycobacterium*, família Mycobacteriaceae, subordem Corynebacteriaceae, ordem Actinomycetales (EUZÉBY, 2013). Apresentam forma bacilar ou cocobacilar com tamanho médio de 0,2 a 0,6 μm de largura por 1 a 4 μm de comprimento, são aeróbios, não possuem motilidade e não formam esporos (CLARK-CURTISS, 1990). As micobactérias apresentam parede celular espessa e complexa, característica de todo gênero *Mycobacterium*, formada por principalmente quatro componentes estruturais, o peptidoglicano associado ao arabinoglicano, ácido micólico e glicolipídios, responsáveis pela resistência e viabilidade celular (JOHNSON e ODELL, 2014; ROMBOOTS et al. 2012). As micobactérias para serem detectadas por microscopia direta precisam estar coradas e são chamados de bacilos álcool-ácido resistentes (BAAR), devido à presença do ácido micólico na parede celular que impede a remoção do corante pelo álcool-ácido.

As micobactérias de crescimento rápido (MCR) fazem parte de um importante grupo entre as micobacterias não tuberculosas (MNT), responsáveis por causar as chamadas micobacterioses (SHAO, 2015). Com o avanço nas técnicas de isolamento e identificação as MCR vêm ganhando atenção, e atualmente são formadas por um grupo de mais de 190 espécies, com 40 espécies patogênicas (UMRAO et al. 2016; KIM e SHIN, 2018). As MCR são classificadas como não patogênicas e potencialmente patogênicas e, fenotipicamente, pela produção de pigmento e tempo de crescimento inferior a sete dias de incubação (CERCA, 2010). De acordo com a patogenicidade as espécies que ganham destaque são *M. abscessus*, *M. asiaticum*, *M. avium*, *M. celatum*, *M. chelonae*, *M. fortuitum*, *M. massiliense* dentre outras (GRIFFITH et al. 2007). As MCR são isoladas do solo e de fontes de água natural e/ou canalizada (VON REYN et al. 2002), sendo o meio ambiente a fonte de infecção para os seres humanos (HALSTROM et al. 2015). Pouco se sabe sobre a principal via de transmissão das MCR, por possuírem parede celular hidrofóbica apresentam maior capacidade de produzir aerossóis mais facilmente que outras bactérias, desta forma acredita-se que a inalação desses aerossóis seja a principal causa das doenças pulmonares (WENDT et al. 1980). A prevalência de doença pulmonar causada por MCR é possivelmente subestimada por não existir a obrigatoriedade de notificação dos casos no Brasil (GORDIN et al. 2007; WEISS et al. 2012).

As micobactérias podem acometer pacientes imunocompetentes, mais a maior prevalência de casos é em pacientes imunodeprimidos, seja com vírus da imunodeficiência adquirida, em tratamento quimioterápico ou recentemente transplantados (CHO et al., 2018; MERTANIASIH et al. 2017). Geralmente em pacientes imonocompetentes a infecção está relacionada com procedimentos invasivos ou lesão prévia no local (GUNDAVDA et al. 2017; VIANA-NIERO, 2008). No entanto, as infecções por MCR podem afetar qualquer tipo de tecido, órgão ou sistema do organismo humano, apresentando sintomas como febre, hiperemia, edema, nódulos, secreções, além de difícil cicatrização com frequentes recidivas (ANVISA, 2007). As MCR comumente isoladas em laboratórios clínicos são as espécies *M. fortuitum*, *M. chelone* e *M. abscessus* por estarem associadas às lesões de pele e tecido subcutâneos (JEON et al. 2017).

O tratamento para as micobacterioses é complexo, envolvendo um longo processo de identificação e determinação da sensibilidade aos antimicrobianos (MERTANIASIH et al. 2017). O tratamento pode ser realizado através da administração de medicamentos tuberculostáticos por um longo período de tempo, com ou sem intervenção cirúrgica na tentativa de minimizar os efeitos (COWMAN et al. 2012). Porém espécies mais patogênicas como, por exemplo, *M. abscessus* são intrinsecamente resistentes aos fármacos existentes (tuberculostáticos) e a cura pode não ser possível (GRIFFITH e AKSAMIT, 2012; MERTANIASIH et al. 2017). Um

dos fatores responsáveis pela resistência aos fármacos antimicrobianos é a grande capacidade de formar biofilmes (VAN INGEN et al. 2011).

2.4.3 *Pythium insidiosum*

O oomiceto aquático *P. insidiosum* pertence ao reino Stramenopila (Supergrupo Stramenopiles-Alveolata-Rhizaria (SAR)), classe Oomycetes, ordem Pythiales, família Pythiaceae, gênero *Pythium* e espécie *Insidiosum* (ALEXOUPoulos, 1996). O gênero *Pythium* é formado por mais de 120 espécies, a maioria habitante do solo, diferente da espécie *insidiosum* que habita ambientes aquáticos de água doce e salgada (GAASTRA et al. 2010; MCCARTHY et al. 2017). Enquanto algumas espécies do gênero *Pythium* são responsáveis por causar grandes perdas agrônômicas, outras são capazes de parasitar fungos e larvas de mosquito. No entanto, apenas a espécie *P. insidiosum* é patogênica para humanos e animais causando uma enfermidade granulomatosa conhecida por pitiose (ALEXOUPoulos, 1996; KRAJAEJUN et al. 2002).

Os primeiros relatos sobre a pitiose foram realizados por Smith (1884) e Drouin (1896) que começaram a observar a natureza micelial do agente etiológico. Com o passar dos anos muitas pesquisas foram realizadas para melhor entendimento sobre esse microrganismo, no ano de 1994, o pesquisador Kwon-Chung através de estudos taxonômicos mais aprofundados observou que o *P. insidiosum* estava filogeneticamente distante dos membros do reino Fungi e estariam de maneira mais próxima das algas do que dos fungos. Dessa maneira *P. insidiosum* passou a pertencer à classe Oomycete que se distanciam dos fungos por não possuir quitina um componente essencial na parede celular de fungos e carece de algumas enzimas para completar a síntese do ergosterol em sua membrana plasmática, tendo como componente predominante a celulose e a β -glucana (HENDRIX, 1964; ALEXOPOULOS et al, 1996). A pitiose ocorre em regiões de clima tropical, subtropical e temperado (Mendoza, 2005) acometendo principalmente equinos, cães e humanos, porém existem casos relatados em gatos, bovinos, ovinos e animais silvestres (PÉREZ et al. 2005; RAKICH et al. 2005; BUERGELT et al. 2006; SANTURIO et al. 2008). No entanto, Berryessa et al. (2008) relataram casos de pitiose na Califórnia onde o clima não se encaixa nessa descrição e White et al (2008) também relataram casos de pitiose no Arizona. Por muitos anos a pitiose foi considerada uma doença incurável com indicação de eutanásia (SANTÚRIO e FERREIRO, 2008).

A forma infectante do *P. insidiosum* é denominada zoósporos, que ao serem liberados na água são atraídos por quimiotaxia para tecidos danificados, onde se fixam-se e emitem tubos germinativos dando início a enfermidade (MILLER, 1983; MENDOZA et al. 1996). Esse oo-

miceto não precisa de um hospedeiro mamífero para sua sobrevivência e propagação, pois consegue se multiplicar em seu ambiente natural em plantas em decomposição (Mendoza et al. 1983). A pitiose acomete animais e humanos imunocompetentes, podendo causar diversas complicações. Em felinos já foram relatadas complicações sistêmicas, desenvolvimento de arterite, queratite e celulite periorbital. As formas subcutâneas e sistêmicas são as mais relatadas em humanos, e estão associadas a α e β -talassemias, comuns no Sudeste da Ásia (IMWIDHAYA, 1994). Em humanos também foram relatados casos de pitiose ocular devido ao prolongado uso de lentes de contato e traumatismos oculares (CASTILLO-JIMÉNEZ et al. 2013). As lesões provocadas pelo oomiceto *P. insidiosum* são do tipo granulomatosas, ulceradas, com abundante secreção sero-sanguinolenta, diferindo-se dos casos atípicos onde as lesões subcutâneas são caracterizadas por grandes massas tumorais circunscritas, recobertas por pele escura, sem ulcerações e pouca secreção (LEAL et al. 2001).

A Tailândia por ser um país com clima tropical úmido, e com prevalência de casos de α e β -talassemias apresenta a maior ocorrência de pitiose humana. Outro fator relevante está associado ao trabalho com plantio de arroz, ambiente propício ao desenvolvimento do patógeno (TRISCOTT et al. 1993). No Brasil, foi relatado apenas um caso de pitiose humana no estado de São Paulo (BOSCO et al. 2005; MARQUES et al. 2006). Diferente da pitiose equina que ocorre com maior frequência no Pantanal Mato-Grossense (SANTOS et al. 2014) e na região sul do Rio Grande do Sul (WEIBLEN et al. 2016).

A pitiose tanto em animais como em humanos é de difícil diagnóstico clínico e laboratorial. As manifestações clínicas podem ser de formas variadas e o diagnóstico laboratorial é lento dificultando a identificação do agente patogênico (GROOTERS, 2003; FARMER et al. 2015). Existem outros métodos laboratoriais mais sensíveis e específicos que incluem imunohistoquímica (BROWN et al. 2008), sorologia através da técnica de ELISA (Ensaio de Imunoabsorção Enzimática) (MENDOZA et al. 1997; SANTURIO et al. 2006), a imunodifusão (MILLER e CAMPBELL, 1982); e técnicas de biologia molecular como a Nested-PCR e o sequenciamento gênico a partir da ampliação do DNA ribossomal (BOTTON et al. 2011).

O tratamento para a pitiose humana e animal é variável, devido as características singulares do *P. insidiosum* (composição parede celular, produção de zoósporos móveis). Todavia, o tratamento é feito utilizando-se a combinação de terapias, que incluem uso de substâncias químicas, técnicas cirúrgicas e a imunoterapia (SANTURIO et al. 2006). A imunoterapia é um dos métodos mais utilizados no Brasil para tratamento da pitiose equina (TOMICICH et al. 2010; ÁLVAREZ et al. 2013). No entanto, existem outros estudos relatando o uso de antibacterianos, antifúngicos e compostos naturais para o tratamento de pitiose animal e humana (JESUS et al.

2014; JESUS et al. 2015; LORETO et al. 2018). Vários estudos testaram a suscetibilidade de óleos essenciais e extratos pelo método de microdiluição em caldo, demonstrando efeitos anti-*P. insidiosum* em concentrações que variaram 50 a 3500 µg/ml (ZANETTE et al. 2011; VALENTE et al. 2016; TROLEZI et al. 2017).

2.5 MECANISMOS DE RESISTÊNCIA BACTERIANA

Os genes de resistência bacteriana (denominados resistoma) assim como o metabolismo bacteriano existem há mais de três bilhões de anos (GAZE et al. 2013), mesmo sem o uso de antimicrobianos no ambiente clínico, incluindo genes que conferem resistência por bactérias patogênicas e também espécies não-patogênicas (WRIGHT et al. 2010). Alguns estudos descrevem a resistência bacteriana como um estado natural do microrganismo (auto-proteção) (ASH et al. 2002; BROWN e BALKWILL, 2009), uma vez que muitas bactérias produzem substâncias antimicrobianas com o intuito de inibir o crescimento de bactérias a procura por nutrientes e também para se comunicar com outras comunidades bacterianas. Ademais, são capazes de sintetizar moléculas bioativas para interagir com outros microrganismos, e em paralelo, desenvolver um sistema de defesa para proteger-se (GAZE et al. 2013).

Os mecanismos de resistência estão amplamente distribuídos no reino microbiano, podendo ser de origem intrínseca ou adquirida. A resistência intrínseca (característica natural do microrganismo) ocorre sem a exposição prévia ao antimicrobiano, por três razões: a) ausência de um processo metabólico influenciável pelo fármaco; b) existência de enzimas com capacidade de inativar o fármaco e; c) presença de particularidades inerentes à morfologia bacteriana (DZIDIC, SUSKOVIC e KOS, 2008). Por exemplo, bactérias Gram-negativas conseguem reduzir a permeabilidade da membrana externa aos compostos hidrofóbicos, tornando-se resistente aos antimicrobianos macrolídeos, lincosamida e estreptogramina B (FLUIT, VISSER E SCHMITZ, 2001). Diferente da resistência adquirida, que ocorre através de dois mecanismos, um relacionado a transferência horizontal de genes e o outro por mutação em diferentes *loci* cromossômicos. Ademais, a transferência horizontal de genes é um processo de aquisição de material genético entre bactérias da mesma espécie que pode ocorrer por três mecanismos genéticos denominados – transformação, transdução ou conjugação e transposição (DZIDIC, SUSKOVIC e KOS, 2008; TODAR, 2011). Diferente do mecanismo de mutação cromossômica que pode ocorrer de forma espontânea ou induzida por ação da radiação (ultravioleta ou ionizante) aos agentes alquilantes e presença de espécies reativas de oxigênio (ERO).

A mutação que acarreta a resistência aos antimicrobianos acontece de forma pontual nos nucleotídeos que originam um fenótipo de resistência (WOODFORD e ELLINGTON, 2007).

Os genes de resistência incorporados no plasmídeo normalmente codificam enzimas que inativam os fármacos se tornando o principal disseminador de resistência, devido a fácil transmissão dos genes entre as diversas espécies (SAMPAIO, 2011). Todavia, existem outros mecanismos importantes capazes de promover a resistência em outras espécies de bactérias, como a produção de enzimas (por exemplo: ligação de um grupo metil ao composto, levando a perda da atividade), alteração da permeabilidade ou absorção da parede celular, expressão de bombas de efluxo (promovendo a retirada do fármaco de dentro da célula bacteriana) e através da formação de biofilmes (WOLOUSE e FARRAR et al. 2014).

2.6 BIOFILME DE *A. hydrophila* – INIBIÇÃO E ERRADICAÇÃO

Os biofilmes são considerados mecanismos de resistência de muitos microrganismos, tornam as células bacterianas menos suscetíveis a ação de agentes antimicrobianos e à morte por mecanismos efetores do sistema imunológico do hospedeiro, possibilitando a sobrevivência em ambientes hostis se dispersando e colonizando novos nichos (DEL POZO, 2018). Os biofilmes são estruturas funcionais complexas formadas por um aglomerado de microrganismo, células e resíduos do ambiente colonizado (proteínas, lipídeos, DNA, enzimas, íons e água) cercados por uma substância polimérica extracelular (SPE) autoproduzida formando uma matriz porosa e hidratada que fica aderida em superfícies bióticas ou abióticas (GUPTA et al. 2015). As SPE representam 90% da massa do biofilme e serve como andaime possibilitando conexão entre célula-célula, além de papel fundamental na estrutura, coesão, tolerância aos antimicrobianos e integridade funcional dos biofilmes (FLEMMING e WINGENDER, 2010; JACKSON et al. 2004; MA et al. 2006). A tabela 2 mostra em etapas definidas e específicas as atribuições da matriz de exopolissacarídeos na formação do biofilme.

Tabela 2: Etapas e atribuições da matriz de exopolissacarídeos na formação do biofilme.

Função	Relevância para Biofilmes
Adesão	Relacionada com a fase inicial da colonização de superfícies abióticas ou bióticas por células planctônicas e a fixação a longo prazo de biofilmes inteiros nas superfícies.
Agregação de células bacterianas	Permite ponte entre células; Imobilização temporária de populações bacterianas; Desenvolvimento de altas densidades celulares.
Coesão de Biofilmes	Forma uma rede de polímeros hidratados, mediando a estabilidade mecânica dos biofilmes, e, através da estrutura de exopolissacarídeos determina a arquitetura do biofilme.

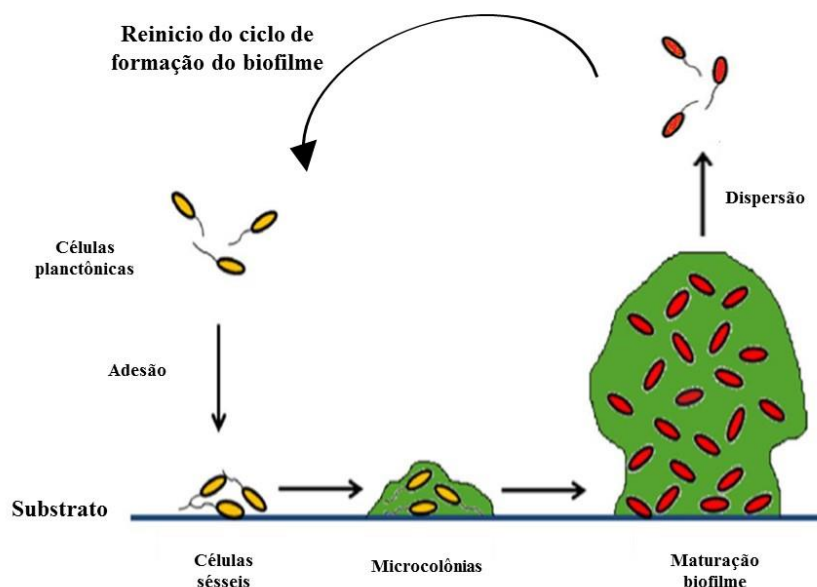
Retenção de Água	Mantém um microambiente altamente hidratado em torno dos microrganismos, levando à tolerância à dessecação.
Barreira de proteção	Confere resistência a defesas inespecíficas e específicas do hospedeiro durante a infecção e confere tolerância a vários agentes antimicrobianos e outros agentes nocivos.
Atividade Enzimática	Permite a digestão de macromoléculas exógenas para aquisição de nutrientes e a degradação do exopolissacarídeos estruturais, permitindo a liberação e células do biofilme.
Fonte de Nutrientes	Carbono, nitrogênio e fósforo fonte de energia utilizada pela comunidade de biofilme.
Troca de Informação Genética	Utilizada para facilitar a transferência horizontal de genes entre células de biofilme.

Fonte: Adaptado de FLEMMING; WINGENDER (2010)

A formação do biofilme é orientada por uma série de processos físicos, químicos e biológicos e só se inicia em resposta a sinais ambientais específicos (TOLKER-NIELSEN, 2015). As etapas do ciclo de formação do biofilme bacteriano relatadas pelo autor Tolker-Nielsen (2015) consistem: a) adesão do microrganismo a uma superfície biótica ou abiótica; b) formação de microcolônias; c) processo de maturação do biofilme e d) dispersão do biofilme. Ademais, todo esse ciclo de vida bacteriano que passa do estilo de vida planctônico (vida solitária) para o estilo de vida biofilme (células sésseis) gera mudanças nas bactérias, levando a produção de adesinas e compostos da matriz extracelular que interconectam o biofilme.

A adesão primária é um processo reversível caracterizado pela aproximação aleatória das células bacterianas planctônicas, através do movimento browniano e forças gravitacionais, ou também pelo auxílio de pílins e flagelos (CARPENTIER, CERF, 2003). Na segunda fase, as células bacterianas começam a produzir as EPS, e o acúmulo de nutrientes evolui para a formação das microcolônias, estruturas fortemente coesas, dando origem a forma irreversível do biofilme (GUPTA et al. 2015). No entanto, quando o biofilme atinge a fase de amadurecimento, passa a desprender microrganismos de sua estrutura que colonizaram outros ambientes, funcionando como nova fonte de contaminação (GARNETT E MATTHEWS, 2013). E esse processo de formação do biofilme termina apenas em resposta a sinais ambientais específicos, como: limitação de nutrientes por exemplo (Figura 3).

Figure 3: Etapas de formação do biofilme bacteriano.



Fonte: Adaptado Tese Pauline Cordenonsi Bonez (2017), com modificações.

Os efeitos nocivos dos biofilmes são fatais, pois desenvolvem resistência antimicrobiana, tornando-se um grave problema de saúde pública (CORTES et al. 2011). Por viverem em comunidades podem ser de 100 a 1000 vezes mais resistentes aos antimicrobianos e biocidas do que as bactérias livres (MAKI et al. 1991; DAVIES et al. 1998; DONLAN et al. 2001). Além disso, estima-se que aproximadamente 80% das infecções são causadas por bactérias formadoras de biofilme, depositadas em implantes médicos invasivos como cateteres intravenosos e urinários, próteses ortopédicas e tubos endotraqueais (CORTES et al. 2011; HOLZAPFEL et al. 2013). Os antimicrobianos amplamente utilizados nos tratamentos clínicos conseguem apenas eliminar bactérias na forma planctônica (vida livre), diferente das células sésseis que continuam se propagando dentro do biofilme (DAROUICHE et al. 1999). Sendo assim, devido à dificuldade no tratamento, maior tempo de internação e custos elevados com medicamentos, novas moléculas estão sendo pesquisadas como alternativas de tratamento capazes de inibir ou erradicar os biofilmes (MARCINKIEWICZ et al. 2013; MARTINEZ-GUTIERREZ et al. 2013).

A inibição da formação do biofilme pode ocorrer através do impedimento da adesão do microrganismo a determinada superfície, interrupção da sinalização celular e através da utilização dos apêndices bacterianos (flagelos e pili) como alvo de ação (COMIN et al. 2016). Em um estudo realizado por Comin e colaboradores (2016) evidenciaram a ação de nanopartículas

de *Melaleuca alternifolia* na motilidade de *Pseudomonas aeruginosa* PA01. Outro estudo realizado com os compostos sulfatiazol e extrato de gengibre, apresentou ação antibiofilme atuando na produção do segundo mensageiro c-di-GMP, o qual está relacionado com a motilidade e produção de adesinas (FAZLI et al. 2014).

Ademais, a capacidade das células bacterianas de detectar a densidade bacteriana pela sinalização dentro da estrutura do biofilme é denominada *Quorum sensing* (QS), (DONLAN, 2001). QS é o mecanismo pelo qual as bactérias Gram-positivas e Gram-negativas desenvolvem biofilmes, produzindo moléculas de sinalização. As bactérias Gram-positivas utilizam oligopeptídeos para comunicação, enquanto que as Gram-negativas utilizam moléculas autoindutoras derivadas de *N*-acil-homoserina lactonas (RENNER e WEIBEL, 2011). Os genes e proteínas relacionados a formação de biofilme também são diferentes para cada microorganismo. Os genes e proteínas responsáveis pela formação do biofilme de *P. aeruginosa* e *Escherichia coli* já são bem documentados, sendo SiaD e SadC e PgaA e PgaD, respectivamente. No entanto, existem poucos estudos sobre a *A. hydrophila*. (WANG et al. 2004; IRIE et al. 2012) e poucos relatos sobre compostos capazes de erradicar o biofilme formado.

Sabendo do impacto causado pelos biofilmes, o desenvolvimento farmacológico e pesquisas que busquem por agentes naturais capazes de perturbar a formação ou mesmo erradicá-los é de fundamental importância. Algumas alternativas terapêuticas já estão sendo utilizadas nesse sentido, como exemplo, uso da enzima dispersina B capaz de promover a dispersão das células sésseis (KIM e PARK, 2013). Outrossim, a utilização de agentes de revestimento capazes de inibir a fixação dos microrganismos na superfície, a utilização de bacteriófagos, terapia fotodinâmica e uso de nanopartículas são boas estratégias para eliminar biofilmes (GUPTA et al. 2015). Porém, ainda não existe nenhum agente biocida capaz de erradicar o biofilme formado (MIQUEL et al. 2016). Nesse contexto, compostos derivados de plantas como óleos essenciais e extratos de ervas são considerados seguros e capazes de atuar apenas no biofilme não comprometendo os tecidos hospedeiros (LAHIRI et al. 2019).

Óleos essenciais, alcalóides, flavonóides, terpenóides, taninos dentre outros apresentam importante ação antioxidante, antimicrobiana e antibiofilme, atuando em estruturas específicas do microorganismo (MURUGAN et al. 2011; ARTINI et al. 2012; TRENTIN et al. 2014; MAJI et al. 2015). Podendo atuar através da interação com a parede celular e membrana de bactérias Gram-positivas e Gram-negativas (NAZZARO et al. 2013). No estudo realizado por Turgis et al. (2009), foi possível observar que as bactérias Gram-negativas (*E. coli* e *Salmonella typhi*) tratadas com óleo essencial de mostarda apresentaram alterações na membrana celular com a aparência rugosa sem brilho, diferente das células bacterianas sem tratamento.

Além da microscopia eletrônica de varredura, a microscopia de força atômica (MFA) foi inventada no ano de 1986 e logo proporcionou grandes avanços no campo da ciência da superfície, incluindo investigações biológicas (BINNING et al. 1986). A tecnologia utilizada na MFA combina a microscopia e a capacidade de estudar a mecânica do objeto (DOMKE e RADMACHER, 1998; EMAD et al. 1998), propriedades imunoquímicas (HINTERDORFER et al. 1996), adesivas (CHEN et al. 1997) e eletrostáticas (ROTSCH e RADMACHER, 1997) em nível nanométrico. Com isso é possível observar a dimensão da célula bacteriana (1 a 5µm) e suas características de superfície (TOLLERSRUD et al, 2001). Danos ocasionados pelo uso de antimicrobianos em cepas de *Staphylococcus aureus* resistente à vancomicina podem ser observados por MFA (BOYLE-VAVRA et al. 2000; BRAGA et al. 1998), também é possível observar a adesão e formação de biofilme de *Pseudomonas putida* (AUERBACH et al. 2000).

2.7 ATIVIDADE ANTIOXIDANTE

O conceito de estresse oxidativo vem sendo estudado a anos, e desde então, a percepção de que reações de redução e oxidação acontecem em células vivas e são utilizadas em processos fundamentais de regulação redox (SIES e JONES, 2007). As diferentes espécies de radicais livres quando em excesso podem desencadear processos fisiopatológicos, como envelhecimento, câncer, inflamação, dentre outros (LIU et al., 2004), por outro lado, são necessárias para uma correta resposta imunológica no organismo, os quais são capazes de combater tumores e infecções microbianas (SOSA et al., 2013).

Para que o organismo humano permaneça em equilíbrio, os agentes oxido-redutores e o sistema de defesa antioxidante são essenciais. Os agentes oxidantes são gerados endogenamente como consequência direta do metabolismo do oxigênio (O₂) e também em situações não fisiológicas, como por exemplo a exposição celular a xenobióticos. O oxigênio molecular é um elemento essencial para a vida, porém a redução incompleta ou a excitação deste elemento durante o metabolismo aeróbico pode levar a produção de espécies reativas de oxigênio (EROs). No entanto, as células apresentam mecanismos de defesa que podem atuar em duas linhas. Uma linha de defesa que atua precocemente antes de ocorrer a lesão, constituída por glutathiona reduzida (GSH), superóxido-dismutase (SOD), catalase, glutathiona-peroxidase (GSH-Px) e vitamina E, e outra linha de defesa que tem função de reparar a lesão ocorrida, sendo constituída pelo ácido ascórbico, pela glutathiona-redutase (GSH-Rd) e pela GSH-Px entre outros (HAYES et al. 2005).

Sabendo da importância dessas moléculas para o organismo humano, muitos pesquisadores realizam pesquisas *in vitro* e *in vivo* para avaliar a atividade antioxidante de compostos naturais com o intuito de deixar claro a segurança e eficácia das plantas para o organismo humano

(PINTO, et al., 2015; PIANA, et al., 2016). Estudos *in vivo* utilizando *C. elegans* estão sendo amplamente utilizados para avaliar a toxicidade e atividade antioxidante de compostos naturais, devido às semelhanças genéticas entre esse nematódeo e mamíferos (SPRANDO et al 2009). Até o momento, nenhuma pesquisa demonstrou o efeito antioxidante da *Achyrocline flaccida*. No entanto, outros estudos relatam o efeito antioxidante de outras espécies da família Asteraceae. Em um estudo realizado por Didier et al. 2011 relataram a composição fenólica e o potencial antioxidante de 18 plantas da família Asteraceae.

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Caracterizar o óleo essencial e extrato aquoso de *A. flaccida*, bem como avaliar a sua possível toxicidade, atividade antioxidante, antimicrobiana e antibiofilme.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Realizar a caracterização fitoquímica do óleo essencial e extrato aquoso de *A. flaccida*;
- Avaliar o potencial de genotoxicidade tanto do óleo essencial como do extrato,
- Avaliar o potencial antioxidante do óleo essencial e do extrato *in vivo* através da análise de ensaios de sobrevivência do *C. elegans* sob condições normais e de estresse oxidativo;
- Realizar testes de microdiluição em caldo com o óleo essencial e extrato frente a isolados de bactérias, micobactérias e oomiceto;
- Avaliar a formação do biofilme de *A. hydrophila* em diferentes tempos;
- Avaliar a formação de biofilme de *A. hydrophila* por microscopia;
- Determinar a ação antibiofilme do extrato de *A. flaccida* frente a cepa de *A. hydrophila*;

4 ARTIGOS CIENTÍFICOS

A revista *Natural Product Research* concedeu permissão para uso dos artigos já publicados apenas na versão impressa desta tese, para mais informações sobre os artigos acesse o DOI.

4.1 COMUNICAÇÃO CURTA I:

***Achyrocline flaccida* essential oil from Brazil: Phytochemical composition, genotoxicity, protective effects on *Caenorhabditis elegans*, and antimycobacterial activity**

Publicado na revista *Natural Product Research*
(Fator de impacto:2.158) (Nat Prod Res.2020 Aug 3;1-5)
Doi:10.1080/14786419.2020.1802269

4.2 COMUNICAÇÃO CURTA II:

Antimycobacterial activity of *Achyrocline flaccida* (Asteraceae) aqueous extract from southern Brazil

Publicado na revista *Natural Product Research*
(Fator de impacto:2.158) (Nat Prod Res.2021 May 27;1-5)
Doi: 10.1080/14786419.2021.1931183.

5. MANUSCRITOS

5.1 MANUSCRITO I:

Enviado para a revista *Natural Product Research*.

***In vitro* anti-*Pythium insidiosum* activity of *Achyrocline flaccida* aqueous extract**

Vanessa S. Machado^{1,2}, Lara B. Ianiski^{1,3}, Paula C. Stibbe^{1,3}, Laura B. Denardi³, Fabiana C. R. Sturmer^{1,2}, Tatiana Emanuelli⁶, Sabrina Somacal⁶, Daniela I. B. Pereira^{1,2}, Camila M. Verdi^{1,2}, Sônia A. Botton^{1,4}, Jânio M. Santurio^{1,3}, Roberto C. V. Santos^{1,2}

¹Universidade Federal de Santa Maria (UFSM), Centro de Ciências da Saúde (CCS), Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Santa Maria, RS, Brazil

²UFSM, CCS, Departamento de Microbiologia e Parasitologia, Laboratório de Pesquisa em Microbiologia Oral, Santa Maria, RS, Brazil

³UFSM, CCS, Departamento de Microbiologia e Parasitologia, Laboratório de Pesquisas Micológicas, Santa Maria, RS, Brazil

⁴UFSM, Centro de Ciências Rurais, Departamento de Medicina Veterinária Preventiva. Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária, Santa Maria, RS, Brazil

⁵Universidade Federal de Pelotas (UFPEL), Programa de Pós-Graduação em Microbiologia e Parasitologia, Instituto de Biologia, Departamento de Microbiologia e Parasitologia, Pelotas, RS, Brazil

⁶Integrated Center for Laboratory Analysis Development (NIDAL), Federal University of Santa Maria, 97105-900, Santa Maria, RS, Brazil

*To whom correspondence should be addressed: Vanessa Schopf Machado & Roberto Christ Vianna Santos. Universidade Federal de Santa Maria (UFSM).

UFSM/CCS/DMP. Av. Roraima, 1000, Prédio 20, Sala 4110, Bairro Camobi. Santa Maria, RS, Brazil. Zip Code 97105-900;

E-mail: vanessasmachado@live.com & robertochrist@gmail.com

***In vitro* anti-*Pythium insidiosum* activity of *Achyrocline flaccida* aqueous extract**

Abstract

Pythium insidiosum is the etiologic agent of pythiosis in humans and animals. This infectious disease is difficult to treat and, so far, no drug has led to a cure. Therefore, this study aimed to evaluate, for the first time, the *in vitro* anti-*Pythium insidiosum* activity of an *Achyrocline flaccida* aqueous extract. The broth microdilution method was used to evaluate the minimal inhibitory concentration and oomycidal concentration of *A. flaccida* aqueous extract against nineteen *P. insidiosum* isolates. The extract inhibited *P. insidiosum* growth in concentrations ranging from 24 to 195 $\mu\text{g mL}^{-1}$ (MIC 50%), 48 to 390 $\mu\text{g mL}^{-1}$ (MIC 90%), and 97 to 781 $\mu\text{g mL}^{-1}$ (MIC 100%). The oomycidal activity was observed in all isolates, and concentrations ranged from 97 to 1562 $\mu\text{g mL}^{-1}$. Additionally, scanning electron microscopy was performed to verify morphological alterations of *A. flaccida* aqueous extract in *P. insidiosum*. The untreated oomycete hyphae had a turgid appearance and smooth surface, while the hyphae treated with the *A. flaccida* aqueous extract presented a rough surface and retracted and brittle aspect. In this sense, as it is a natural product commonly used in South America, it presents significant anti-*Pythium insidiosum* activity and may represent, in the future, a therapeutic alternative against pythiosis.

Keywords: oomycete, pythiosis, natural compound, susceptibility, *Achyrocline flaccida*.

Introduction

Pythium insidiosum belongs to the class of Oomycetes, order Pythiales, family Pythiaceae, genus *Pythium* and species *insidiosum*. This microorganism is an aquatic oomycete and etiological agent of pythiosis in humans and animals. The development of this microorganism occurs in regions of tropical, subtropical and temperate climate, presence of wetlands and abundant vegetation. Under these conditions, it produces mobile biflagellate zoospores responsible for infection in mammals,^{1,2} and cases of pythiosis have been reported in equines, dogs, humans, and others species. Thailand is the region most affected by human pythiosis,³ and Brazil has the highest occurrence of equine pythiosis.^{4,5} The clinical manifestation in mammals varies according to the species affected and can manifest as cutaneous, gastrointestinal, ophthalmic, or systemic pythiosis.¹ This microorganism is similar to true fungi, albeit it lacks ergosterol in its cytoplasm membrane,⁶ making therapy based on antifungal drugs quite difficult. There is no effective treatment for pythiosis until the present moment, although numerous researchers have conducted *in vitro*⁷⁻⁹ and *in vivo*¹⁰⁻¹¹ studies seeking new effective compounds against *P. insidiosum*.

Furthermore, many plants and their secondary metabolites are being studied as alternatives in the search for new molecules to prevent or treat various diseases. In this sense, essential oils and plant extracts are promising alternatives given that their bioactive components have antibacterial, antiviral, antifungal, and antiparasitic activity and antimycobacterial properties.¹² In addition, the importance of compounds derived from medicinal plants is due to their minimal

toxicity to host cells, strong therapeutic potential, low risk of developing microbial resistance,¹³ and potential antioxidant activity.¹⁴

Achyrocline flaccida (Weinm.) DC. is frequently found and collected in southern Brazil.¹⁵ This plant is commonly used for various therapeutic purposes given its emmenagogue, anthelmintic, tonic, and antispasmodic properties,¹⁶ and these therapeutic effects may be related to its chemical composition and high phenolic compound content (~89% belong to the flavonoid class), including the presence of 3-O-methylquercetin, quercetin, and luteolin.¹⁷ In fact, our research group has already reported the antimycobacterial activity of both *A. flaccida* essential oil and its extract.^{17,18}

Despite its wide use and importance, there are few studies on this species. In this context, with the new global trends of concern with biodiversity and ideals of sustainable development, medicinal plants have been one of the main lines of research in discovering new molecules with therapeutic action.^{19,20} A new alternative is urgently needed to treat pythiosis humans and animals. Therefore, this study sought to evaluate the *in vitro* anti-*P. insidiosum* activity of an *A. flaccida* aqueous extract, which is a plant popularly used in South America.

Materials and Methods

Preparation and characterization of the *A. flaccida* aqueous extract

The aqueous extract was obtained by hydroalcoholic maceration, as demonstrated by Machado et al.¹⁷ Quantification and identification were performed in a reverse-phase C-18 Hypersil Gold column and analyzed using high-performance liquid chromatography (HPLC) coupled to a photodiode array detector (PDA) (SPDM-20A Prominence, Shimadzu, Japan). Compounds were identified using a system connected to a Q-TOF analyzer (Bruker Daltonics, model micrOTOF-QIII, Bremen, Germany).

Toxicity of the *A. flaccida* aqueous extract

The toxicity of the aqueous extract was evaluated *in vivo* using *Caenorhabditis elegans*. The different concentrations (195 – 12,500 µg mL⁻¹) of the *A. flaccida* aqueous extract showed no toxicity.¹⁷

P. insidiosum isolates

Seventeen Brazilian clinical *P. insidiosum* isolates and CBS 119455 (human isolate) and CBS 575.85 (equine isolate) standard strains were used. All isolates were previously characterized according to Weiblen et al.²¹ (Table 1).

Inoculum preparation

The zoospore inoculum (2 to 3 x 10³ zoospore/mL) diluted in RPMI 1640 broth (1:10; pH 7.0) were obtained by the zoosporogenesis process²² and following the modifications according to Ianiski et al.²³ The zoospores were counted in a Neubauer chamber under optical microscopy (100 and 400 x).

In vitro susceptibility tests

In vitro susceptibility tests of *P. insidiosum* were carried out using the M38-A2 protocol standards of the Clinical and Laboratory Standards Institutes,²⁴ with modifications according to Pereira et al.²² The *A. flaccida* aqueous extract was distributed in 96-well plates with concentrations ranging from 24 to 12.500 µg mL⁻¹. The positive control consisted of RPMI medium and *P. insidiosum* inoculum, while the negative control was RPMI medium and *A. flaccida* aqueous extract. In the plate reading, MIC 100 (100% growth inhibition), MIC 90 (≥90% and <100% growth inhibition), and MIC 50 (≥50% and <90% growth inhibition) were determined for all isolates. Additionally, the minimum oomicidal concentration (MOC) was determined and based on the MIC 100 of each isolate. The MOC determination was performed in tubes containing Sabourand dextrose broth incubated at 37 °C/24 h. The MOC interpretation considered if there was or if there was not mycelial growth against the tested compound for each isolate. All assays were performed in triplicate.

Scanning electron microscopy

Scanning electron microscopy (SEM) was performed according to Valente et al.²⁵ *P. insidiosum* hyphae (CBS 119 455) was treated with *A. flaccida* aqueous extract at a sublethal dose (24 µg mL⁻¹), and the control *P. insidiosum* hyphae (CBS 119 455) (untreated) were fixed with glutaraldehyde (2.5%) at 4 °C/48 h. After washing with sterile distilled water, the hyphae were subjected to baths with increasing ethanol concentrations (30, 50, 70, 95, and 100%) (20 µL/50 s). The hyphae were then subjected to oven drying at 37 °C/24 h. Afterward, the samples were plated with metallic gold and visualized at 5 kV in a scanning electron microscope (Jeol Modelo JSM 6360).

Results and Discussion

The susceptibility results for *P. insidiosum* isolates treated with *A. flaccida* aqueous extract are listed in Table 2. The *A. flaccida* aqueous extract inhibited *P. insidiosum* growth (n=19) at concentrations ranging from 24 to 195 µg mL⁻¹ (MIC 50%), 48 to 390 µg mL⁻¹ (MIC

90%), and 97 to 781 $\mu\text{g mL}^{-1}$ (MIC 100%). The results for oomicidal concentrations ranged from 97 to 1562 $\mu\text{g mL}^{-1}$.

The characterization of *A. flaccida* aqueous extract high-performed liquid chromatography analysis showed that of the phenolic compounds in the extract ($479.23 \pm 21.40 \mu\text{g mL}^{-1}$ aqueous extract), ~89% belonged to the flavonoid class, highlighting the presence of 3-O-methylquercetin (22.5%), quercetin (18%), and luteolin (12%).¹⁷ Our data are in line with Araújo et al.,²⁶ who reported the effects of propolis and geopropolis extracts produced by *Melipona compressipes fasciculata* and showed that they could inhibit *P. insidiosum* isolates at concentrations varying from 1000 and 3400 $\mu\text{g mL}^{-1}$. In addition, the authors evaluated the possible mechanism of action of the propolis and geopropolis extracts using *Saccharomyces cerevisiae* as a model to study genetic and cell biology.²⁶ Their findings demonstrated that the extract could induce cell death by apoptosis and secondary necrosis. Additionally, propolis induced the accumulation of reactive oxygen species during apoptosis.²⁶ Knowing the composition of geopropolis and propolis (flavonoids and phenolic acid esters), the possible effects of *A. flaccida* extract aqueous may be due to their chemical compounds.

This study corroborates earlier research that reported anti-*P. insidiosum* action of plants; nonetheless, our study highlights the first use of an aqueous extract obtained from *A. flaccida*, while most experiments have evaluated plant essential oils including *Origanum majorana*, *Mentha piperita*, *Rosmarinus officinalis*, and *Melaleuca alternifolia* against this oomycete.^{11,26,27} Moreover, our findings evidenced that *P. insidiosum* susceptibility to *A. flaccida* occurred over a wide MIC range, albeit similar observations have also been reported in studies employing essential oils and their major components.^{11,26,27}

In the SEM analysis, *P. insidiosum* hyphae control (without *A. flaccida* aqueous extract treatment) presented a turgid appearance and smooth surface, evidencing no morphological alterations (Figure 1A). In contrast, *P. insidiosum* hyphae treated with a sublethal ($24 \mu\text{g mL}^{-1}$) concentration of *A. flaccida* aqueous extract had a rough surface and retracted and brittle aspect (Figure 1B). More recently, Trolezi et al.¹¹ reported the *in vitro* effects of the methanol extract of *Stryphnodendron adstringens* by SEM and demonstrated that the hyphae treated with the extract showed rough cell wall surfaces, high amounts of granular material, and release of amorphous material. Subsequently, Valente et al.¹¹ evaluated biogenic silver nanoparticle activity and Ianisky et al.²³ tested azithromycin and amorolfine hydrochloride against *P. insidiosum*; the authors observed morphological changes in the treated hyphae in SEM, which is quite similar to our findings.

In vitro activity of *A. flaccida* aqueous extract against the oomycete *P. insidiosum* was demonstrated herein. Additional investigations are needed to clarify the possible mechanisms of action of this extract to obtain a possible phytotherapeutic agent and/or co-adjuvant for the control of pythiosis.

Acknowledgments

Additionally, this work was supported by Brazilian funding agencies: Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico – CNPq [grant number 310360/2019-6]; Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio Grande do Sul - FAPERGS [grants numbers 17/1075-2 and 17/2551-0001]; and Coordenação de Pessoal de Nível Superior – CAPES [financial code 001 and 88882.428189/2019-01]. We would also like to acknowledge Atlas Assessoria Linguística for support with the English version of this manuscript.

Declaration of interest

No potential conflict of interest was reported by the authors.

References

1. Gaastra W, Lipman LJ, De Cock AW et al. *Pythium insidiosum*: an overview. *Vet Microbiol.* 2010; 146: 1–16.
2. Yolanda H and Krajaejun T. Review of methods and antimicrobial agents for susceptibility testing against *Pythium insidiosum*. *Heliyon.* 2020; e03737.
3. Krajaejun T, Sathapatayavongs B, Prachartam R et al. Clinical and epidemiological analyses of human pythiosis in Thailand. *Clin Infect Dis.* 2006; 43:569–576.
4. Santos CEP, Ubiali DG, Pescador CA, Zanette RA, Santurio JM, Marques LC. Epidemiological survey of equine pythiosis in the Brazilian Pantanal and nearby areas: results of 76 cases. *J Equine Vet Sci.* 2014; 34: 270–274.
5. Weiblen C, Machado G, Jesus FPK et al. Seroprevalence of *Pythium insidiosum* infection in equine in Rio Grande do Sul, Brazil. *Cienc Rural.* 2016; 46: 26–131.
6. Mendoza L and Newton JC. Immunology and immunotherapy of the infections caused by *Pythium insidiosum*. *Med Mycol J.* 2005; 43: 477-486.
7. Suthiwong J, Thongsri Y, Yenjai C. A new furanocoumarin from the fruits of *Scaevola taccada* and antifungal activity against *Pythium insidiosum*, *Nat. Prod. Res.* 2017; 31: 453–459.
8. Posri P, Suthiwong J, Thongsri Y, Yenjai C. Antifungal activity of compounds from the stems of *Dalbergia stipulacea* against *Pythium insidiosum*, *Nat. Prod. Res.* 2019 (in press).

9. Wittayapipath K, Yenjai C, Prariyachatigul C, Hamal P. Evaluation of antifungal effect and toxicity of xanthyletin and two bacterial metabolites against Thai isolates of *Pythium insidiosum*, *Sci. Rep.* 2020; 10: 4495.
10. Loreto ÉS, Alves SH, Santurio JM, Nogueira CW, Zeni G. Diphenyl diselenide *in vitro* and *in vivo* activity against the oomycete *Pythium insidiosum*. *Vet Microbiol.* 2012; 156: 222–226.
11. Trolezi R, Azanha JM, Paschoal NR et al. *Stryphnodendron adstringens* and purified tannin on *Pythium insidiosum*: *in vitro* and *in vivo* studies, *Ann. Clin. Microbiol. Antimicrob.* 2017; 16: 7.
12. Bua A, Mollicotti P, Donadu MG et al. “*In vitro*” activity of *Melaleuca cajuputi* against mycobacterial species. *Nat. Prod. Res.* 2018; 1-4.
13. Nazzaro F, Fratianni F, Martino L et al. Effect of essential oils on pathogenic bacteria. *Pharmaceuticals.* 2013; 6: 1451-1474.
14. Stolz ED, Muller LG, Trojan-Rodrigues M, et al. Survey of plants popularly used for pain relief in Rio Grande do Sul, southern Brazil. *Rev Bras Farmacog.* 2014; 24: 185-196.
15. Da Rosa J, Weber GG, Cardoso R, Górski F, Da-Silva PR. Variability and population genetic structure in *Achyrocline flaccida* (Weinm.) DC., a species with high value in folk medicine in South America. *PLoS One.* 2017; 12: 1–19.
16. Retta D, Dellacassa E, Villamil J et al. Marcela, a promising medicinal and aromatic plant from Latin America: a review. *Ind Crops Prod.* 2012; 38: 27-38.
17. Machado VS, Verdi CM, Rossi GG et al. Antimycobacterial activity of *Achyrocline flaccida* (Asteraceae) aqueous extract from Southern Brazil. *Nat Prod Res.* 2021; 27: 1-5.
18. Machado VS, Verdi CM, Somacal S et al. *Achyrocline flaccida* essential oil from Brazil: phytochemical composition, genotoxicity, protective effects on *Caenorhabditis elegans*, and antimycobacterial activity. *Nat Prod Res.* 2020; 0:1–5.
19. Horinouchi CDS, Mendes DAGB, Soley BS et al. *Combretum leprosum* Mart. (Combretaceae): potential as an antiproliferative and anti-inflammatory agent. *J Ethnopharmacol.* 2013; 145: 311-319.
20. Piana M, Camponogara C, Boligon AA et al. Topical anti-inflammatory activity of *Solanum corymbiflorum* leaves. *J ethnopharmacol.* 2016; 179: 16-21.
21. Weiblen C, Azevedo MI, Ianiski LB et al. Genotyping of South American clinical isolates of *Pythium insidiosum* based on single nucleotide polymorphism-based multiplex PCR. *Cienc Rural.* 2019; 49: 01 e20180744.

22. Pereira DIB, Santurio JM, Alves SH, et al. Caspofungin *in vitro* and *in vivo* activity against Brazilian *Pythium insidiosum* strains isolated from animals. *J Antimicrob Chemother.* 2007; 60: 1168–1171.
23. Ianiski LB, Stibbe PC, Denardi LB et al. *In vitro* anti-*Pythium insidiosum* activity of amroline hydrochloride and azithromycin, alone and in combination: Antimicrobial effect anti-*P. insidiosum*. *Med Mycol.* 2021; 59: 67-73.
24. Clinical Laboratory Standards Institute. *Reference Method for Broth Dilution Antifungal Susceptibility Testing of Filamentous Fungi—2nd Edition: Approved Standard M38-A2.* Wayne, PA, USA: CLSI, 2008.
25. Valente JSS, Braga CQ, Brasil CL et al. *In vitro* anti-*Pythium insidiosum* activity of biogenic silver nanoparticles. *Med Mycol.* 2019; 57: 858–863.
26. Araújo MJAM, Bosco SDMG and Sforcin JM. *Pythium insidiosum*: inhibitory effects of propolis and geopropolis on hyphal growth. *Braz. J. Microbiol.* 2016; 47: 863-869.
27. Fonseca AOS, Pereira DIB, Jacob RG et al. *In vitro* susceptibility of Brazilian *Pythium insidiosum* isolates to essential oils of some *Lamiaceae* Family species. *Mycopathologia.* 2015; 179: 253–258.
28. Valente JSS, Fonseca AOS, Denardi LB et al. *In vitro* activity of antifungals in combination with essential oils against the oomycete *Pythium insidiosum*. *J Appl Microbiol.* 2016; 4: 998–1003.

Table 1. *In vitro* susceptibility ($\mu\text{g mL}^{-1}$) of *A. flaccida* aqueous extract against *P. insidiosum* isolates (n=19).

Isolate	<i>GenBank</i> [#]	Isolate source	MIC 100%	MIC 90%	MIC 50%	MOC
2H	EF016855	Human	97	48	24	97
4H	AB971178	Equine	195	97	24	781
138	JN126285	Equine	781	390	97	781
142	MH813297	Equine	781	390	97	781
178	JN126295	Equine	390	195	48	1562
254	MH813300	Equine	390	195	48	390
260	JN126307	Equine	390	195	48	390
289	MT192477	Equine	781	390	97	1562
291	MH813302	Equine	390	195	48	390
292	MT192478	Equine	390	195	48	390
294	MT126182	Equine	390	195	48	781
295	MH813304	Equine	781	390	97	781
296	MH813305	Equine	781	390	97	781
337	MH813306	Equine	390	195	48	390
338	MT192479	Equine	390	195	48	390
357	MN422143	Equine	390	195	48	1562
361	MN422144	Equine	390	195	48	781
363	MT192481	Canine	390	195	97	390
364	MT192482	Equine	781	390	195	781

[#]*Genbank* accession number corresponding to rDNA (ITS) sequences; MIC, minimal inhibitory concentration; MOC, minimum oomycidal concentration.

Table 2. *In vitro* activity of *A. flaccida* aqueous extract against *P. insidiosum* isolates (n=19).

		Number of isolates (%) following MIC/MOC ($\mu\text{g mL}^{-1}$)										MIC			
Agent		24	48	97	195	390	781	1562	3125	6250	12500	Range	GM	MIC ₅₀	MIC ₉₀
Aqueous															
extract	MIC ₁₀₀	0	0	1 (5.26%)	1 (5.26%)	11 (57.9%)	6 (31.58%)	0	0	0	0	97-781	435.16	390	781
	MIC ₉₀	0	1 (5.26%)	1 (5.26%)	11 (57.9%)	6 (31.58%)	0	0	0	0	0	48 - 390	217.32	195	390
	MIC ₅₀	2 (10.53%)	10 (52.63%)	6 (31.58%)	1 (5.26%)	0	0	0	0	0	0	24 - 195	59.99	48	97
	MOC	0	0	1 (5.26%)	0	7 (36.84%)	8 (42.11%)	3 (15.79%)	0	0	0	97 - 1562	604.50	-	-

MIC, minimum inhibitory concentration; MOC, minimum oomicidal concentration; MIC₁₀₀, 100% growth inhibitory concentration; MIC₉₀, 90% growth inhibitory concentration; MIC₅₀, 50% growth inhibitory concentration; MIC₅₀, minimum concentration to inhibit the growth of 50% of isolates; MIC₉₀, minimum concentration to inhibit the growth of 90% of isolates; GM, geometric mean.

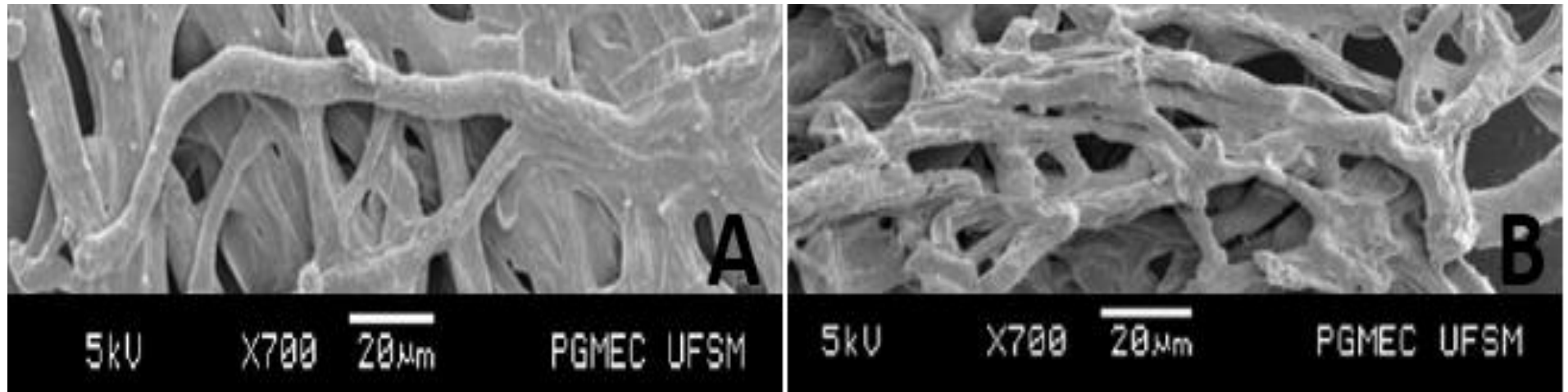


Figure 1: *Pythium insidiosum* ultrastructure (CBS 119455) visualized by SEM. A) Control. *Pythium insidiosum* hyphae with turgid appearance showing a smooth and regular surface. B) *Pythium insidiosum* hyphae treated with [24 µg mL⁻¹] *A. flaccida* aqueous extract with appearance showing a rough surface and retracted and brittle aspect of the hyphae. Magnitude: A and B x700.

5.2 MANUSCRITO II:

Fase de ajustes finais.

Antibacterial and antibiofilm effects of *Achyrocline flaccida* extract against
Aeromonas hydrophila

Autores: Vanessa Schopf MACHADO^{a*}, Camila Marina VERDI^a, Fabiana de Cássia Romana STURMER^a, Ticiane da Rosa PINHEIRO^a, Thais BARIN^a, Daniela DALCIN^a, Dariane J. CLERICI^a, Sabrina SOMACAL^b, Michele Rorato SAGRILLO^c, Tiago BURGO^d, Roberto Christ Vianna SANTOS^{a*}

^a Laboratory of Oral Microbiology Research (LAPEMICRO), Federal University of Santa Maria, 97105-900, Santa Maria, RS, Brazil.

^b Integrated Center for Laboratory Analysis Development (NIDAL), Federal University of Santa Maria, 97105-900, Santa Maria, RS, Brazil

^c Cell Culture Laboratory, Graduate Program in Nanoscience – Franciscan University, 97010-491, Santa Maria, RS, Brazil.

^d Coulomb Electrostatic and Mechanochemical Laboratory, Federal University of Santa Maria, 97105-900, Santa Maria, RS, Brazil

*To whom correspondence should be addressed: Vanessa Schopf Machado & Roberto Christ Vianna Santos. Federal University of Santa Maria (UFSM).

UFSM/CCS/DMP. Av. Roraima, 1000, Prédio 20, Sala 4110, Bairro Camobi. Santa Maria, RS, Brazil. Zip Code 97105-900;

E-mail: vanessasmachado@live.com & robertochrist@gmail.com

Abstract

The aimed of this study was to evaluate *in vitro* biofilm production by *Aeromonas hydrophila* in polyethylene plates, and antibacterial and antibiofilm action of *Achyrocline flaccida* aqueous extract (AAE). The quantification of biofilm formation was performed by crystal violet and colony counting assays. Through these assays, it was possible to observe that the biofilm formation occurs in the time range 12 and 24 hours. The minimum inhibitory concentration (MIC) and minimum bactericidal concentration (MBC) of AAE against *A. hydrophila* was determined using the broth microdilution method. The results for MIC and MBC were the 5000 $\mu\text{g mL}^{-1}$. AAE also showed a potential effect in the inhibition and reduction of forming biofilm observed with atomic force microscopy. Hence, this search demonstrated the use of AAE as a possible phytotherapeutic agent to control *A. hydrophila* biofim formation.

Key-words: Marcela; MIC; Phytotherapy; Polyethylene plates; *In vitro*.

1 Introduction

In recent years, outbreaks of foodborne bacterial diseases have been reported worldwide, some caused by agents called classics, such as *Staphylococcus aureus*, *Clostridium perfringens* and *Salmonella* spp., but the vast majority caused by emerging bacteria, including *Aeromonas* spp. (Rodriguez-Morales & Castañeda-Hernández, 2014). *Aeromonas hydrophila* is an important Gram-negative opportunistic pathogen, responsible by cause infection in humans specially children and immunocompromised individuals, being that the contamination occurs through ingestion water and others food (fish, crabs, shrimps, mollusks) contaminated (Dias et al. 2016).

Aeromonas spp. infection is responsible for gastroenteritis, chronic diarrhea and even septicemia in human, and is treated with antimicrobial drugs. In addition, in search published recently by Mohanty et al. (2020) demonstrated *Aeromonas hydophila* cause urinary tract infection. However, the indiscriminate and prolonged use of antibiotics to treat bacterial diseases has resulted in the emergence of antibiotic resistant bacterial strains (El-Nahhal et al. 2016; Grenni et al. 2018). Recently, Rosso et al., (2019) studied 21 cases of *Aeromonas* infection in hospitalized patients with phenotypic resistance to carbapenems, with *Aeromonas hydrophila* being the most common species - present in 19 patients. In view of this scenario, the scientific community is looking for alternatives that are as or more effective than traditional antibiotics and do not promote bacterial resistance. The use of food additives, probiotics, prebiotics, essential oils, and plant extracts has increased considerably to help treat bacterial disease and/or improve the immune system (Dong et al. 2021; Sutili et al. 2015; Yarahmadi et al. 2016). Moreover, natural agents having plant secondary metabolites to be the safest as they and do not harm the host tissues surroundings the biofilms while acting upon them (Lahiri et al. 2019).

The pathogenic potential of *A. hydrophila* is related to the production of multiple virulence factor, where biofilm is highlighted. Biofilms allow microorganisms to attach and colonize surfaces formed by different materials (Pandey et al. 2014). Different materials are used in the manufacture of medical devices, such as polypropylene which is used in a variety of catheters, except in urinary catheters and high-density polyethylene which is commonly found in the constitution of orthopedic prostheses (Sinha et al. 2017). In this situation, when biofilm formation occurs these materials there is no treatment alternative capable of removing the biofilm, and mechanical removal is the only option available to control the infection (Carmona-Torre et al. 2017). According to Cai and Arias (2017) *A. hydrophila* (ML-09-119) is able to colonize and multiply on different materials such as liner, flexible polystyrene plates, and nets. In the clinical medical the biofilm formation is the red light for major complications, for example, the patients who use catheters and prostheses, the bacterial are able to attach to these materials and form biofilm. Thus, when biofilm formation occurs on medical materials, mechanical removal is the only option available for infection control since (Carmona-Torre et al. 2017). In this context, novel strategies need to be developed against *A. hydrophila* infections.

Achyrocline flaccida, popularly known as “macela” or “marcela”, is a plant well known and used in southern Brazil due to its use in combating gastrointestinal complications (Hieronymus, 1882; Parodi, 1886; Paccard, 1905). Recently, *A. flaccida* essential oil and aqueous extract have been shown to have an antimycobacterial action (Machado et al. 2020; Machado et al. 2021). In addition, other species of Asteraceae family report beneficial properties to health, such as anti-inflammatory, antioxidant, and antimicrobial action (Rosa et al. 2017; Stolz et al. 2014; Alaniz et al. 2010).

Hence, the present investigation aimed to understand the process of *A. hydrophila* biofilm formation and efficacy of *A. flaccida* aqueous extract with antibacterial and antibiofilm agent.

2 Material and methods

2.1 Botanical identification and *A. flaccida* aqueous extract production

A. flaccida were collected in Jaguari (Rio Grande do Sul State, Brazil) in March of 2018 (29°25'57.61'S and 54°34'8.83'W). The plant material was identified by Professor Renato Aquino Záchia (botanical), and a dried voucher specimen is preserved in the herbarium of the Biology Department at the Federal University of Santa Maria (No. SMBD 17.841), registered in the Management of Genetic Patrimony Council, Brazil (CGEN, process number A76E00E).

The extract was obtained by hydroalcoholic maceration of 25 g of inflorescence in 500 mL and 70% ethanolic solution (v/v), at room temperature (25 °C), protected from the light, and with agitation once a day for 15 days. After this period, the extract was filtered and submitted to the rotary evaporator to eliminate the ethanol (40 °C under reduced pressure) and volume adjusted with sterile distilled water, getting an initial concentration of 50 mg mL⁻¹. Phytochemical characterization of the *A. flaccida* aqueous extract has been previously published (Machado et al. 2021). To perform susceptibility and biofilm tests, the *A. flaccida* aqueous extract was diluted in different concentrations of range 39; 78; 156; 312; 625; 1250; 2500; 5000; 10000 and 20000 µg mL⁻¹) in Brain Heart Infusion (BHI) broth.

2.2 Preparation of the inoculum of *A. hydrophila*

A. hydrophila (ATCC 7966) was obtained by American Type Culture Collection. This microorganism was maintained on culture medium with glycerol and cooled at -80°C. Before all assay, *A. hydrophila* was grown in BHI broth at 35°C for 24 h. After, the suspension of *A. hydrophila* was prepared in BHI, turbidity (OD₆₃₀) equivalent to 10⁸ CFU mL⁻¹, to use for the assay's preparation the dilution 1/20 in BHI, equivalent to 10⁵ CFU/mL⁻¹. All inoculum was prepared in BHI broth.

2.3 Quantification biofilm formation in polyethylene plate

A. hydrophila biofilm formation was evaluated at different times (0, 6, 12, 24, 48, 72 and 96 h) by two different methods: colony count and violet crystal. Small plates of high-density polyethylene (1.0 cm and 1 mm thick) were sterilized by UV radiation according to Borges et al. (2012), and used for the assessment of biofilm formation. The small plates (Braskem, São Paulo, Brazil) were incubated at 35°C for 0, 6, 12, 24, 48, 72 and 96 h into 12-well plates containing 300 µL of BHI broth and 300 µL of inoculum (10⁵ CFU mL⁻¹) per well. After each incubation time, the polyethylene plates were removed of the well and quantification the total biofilm.

2.3.1 Quantification of total biofilm by colony count

The quantification of total biofilm was performed according to Alvarez et al. (2006) and Cai and Arias (2017) with modifications. After incubation the culture medium was discarded, and polyethylene plate was washed three time with 1 mL of sterile water. The adhered cells were packed in falcon with 1 mL of saline 0.9% and vortexed for 10 minutes. Dilutions of 1/100, 1/1000, and 1/10.000 were made in saline 0.9%. One microliter (1 µL) of these dilutions

were sown in plates containing BHI agar and incubated for 24 h at 35°C. After this period, sessile colonies were counted.

2.3.2 Quantification of total biofilm by crystal violet

The quantification of total biofilm was performed according to Alvarez et al. (2006) with modifications. After incubation time, the culture medium was discarded, and the polyethylene plate was washed three times with 1 mL of sterile water. The adhered cells were stained with 600 µL of 1% of crystal violet for 15 minutes at room temperature. After, the dye was removed and the polyethylene plate were washed with sterile water for three more times. The crystal violet retained by the adhered cells was dissolved by 600 µL of 95% absolute alcohol during 10 min and bacterial growth was quantified by measuring the optical density (OD) at 570 nm with a spectrophotometer (Spectra-max M2e Multimode Microplate Reader, Molecular Devices, USA).

2.4 Determination of Minimum Inhibitory Concentration (MIC) and Minimum Bactericidal Concentration (MBC)

After knowing the biofilm formation profile of *A. hydrophila*, we performed assay to evaluate the antibacterial and antibiofilm potential of the extract of *A. flaccida*. The MIC and MBC were performed by broth microdilution method from the Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) guidelines (CLSI, 2014), document VET04-A2. Different concentrations of the extract of *A. flaccida* (39 – 20000 µg mL⁻¹) were add on wells containing BHI. After the process, 10 µL of inoculum (10⁵ CFU mL⁻¹) was added and incubated for 24 hours at 35°C. MIC is defined as the lowest concentration of extract capable of inhibiting bacterial growth. The MBC was observed after well replication in the absence of bacterial growth on BHI agar plates. The tests were performed in triplicate.

2.5 *A. flaccida* aqueous extract effect on inhibition and destruction of the biofilm formed by *A. hydrophila*

2.5.1 Inhibition of formation of the biofilm

To assess potential of the *A. flaccida* aqueous extract to inhibit the biofilm formed, new polyethylene plates were incubated in absence or presence of *A. flaccida* aqueous extract. In the 12- well plates were added 300 µL of the inoculum (10⁵ UFC mL⁻¹) and 300 µL of the *A.*

flaccida aqueous extract in the concentration of $1250 \mu\text{g mL}^{-1}$ (1/4 MIC) and $2500 \mu\text{g mL}^{-1}$ (1/2MIC), following the incubation period at 35°C for 24 h. Positive control was prepared with $300 \mu\text{L}$ of the inoculum (10^5 UFC/mL) and $300 \mu\text{L}$ of BHI broth) and negative control was prepared with $300 \mu\text{L}$ sterile distilled water and $300 \mu\text{L}$ of BHI broth, following the incubation period. Color control of the extract was performed for all concentrations ($300 \mu\text{L}$ of the extract and $300 \mu\text{L}$ BHI broth). After, the inhibition of biofilm formation was evaluated through violet crystal methodology as described in section 2.3.2.

2.5.2 Destruction of the biofilm formed

For biofilm formation, in the 12-well plates have been added $300 \mu\text{L}$ of the inoculum (10^5 UFC/mL) and incubated for 35°C for 24 h. After this time, was added $300 \mu\text{L}$ of the *A. flaccida* aqueous extract at a concentration of $2500 \mu\text{g mL}^{-1}$ (1/2 MIC) and $5000 \mu\text{g mL}^{-1}$ (MBC), following additional incubation period. Positive control has been prepared with $300 \mu\text{L}$ of the inoculum and $300 \mu\text{L}$ of the sterile water. The negative control has been prepared with $300 \mu\text{L}$ of the sterile water and $300 \mu\text{L}$ of BHI broth. Color control of the extract was performed for all. The destruction of the biofilm formed was evaluated by violet crystal methodology as described in section 2.3.2.

2.5.3 Atomic Force Microscopy (AFM)

Atomic Force Microscopy (AFM) was used to investigate biofilm formation and morphology alterations. AFM analyzes to assess biofilm inhibition were performed as described in section 2.5.1. and for the biofilm destruction according to section 2.5.2. using polyethylene plates (1cm x 1 cm). After incubations, polyethylene plates were removed from the culture medium and washed three times with 1 mL of sterile water to remove the non-adhered cells. Then, the polyethylene plates are fixed with absolute methanol ($600 \mu\text{L}$) for 1 minute. After this time, the plates were removed from the alcohol and left to dry at room temperature. Topography maps ($20 \times 20 \mu\text{m}^2$ and 512×512 pixels) were recorded on a Park NX10 microscope (NX10 Park Systems, Suwon, Korea) using a high frequency rotated monolithic silicon probe with symmetric tip shape (BudgetSensors TAP300G, Sofia, Bulgaria). All measurements were conducted under room temperature of $20 \pm 5^\circ\text{C}$ and relative humidity of $50 \pm 10\%$. Images were treated offline using Park XEI software version 4.3.4 Build22.RTM1. For statistical representativeness, each sample was imaged, at least, in three different regions.

2.6 Statistical analyses

All experiments were performed in triplicates. Two-way ANOVA was used to analyze the statistical significance of *A. hydrophila* biofilm formation in polyethylene plates, followed by Tukey's test. Data from the assays for evaluating the inhibition and destruction of the biofilm by *A. flaccida* aqueous extract were used one-way ANOVA followed by Dunnett's multiple comparisons test. All analyzes were performed using GraphPad Prism (version 6) and a p -value of ≤ 0.05 was considered statistically significant.

3 Results and Discussion

Currently, *A. hydrophila*, together with *A. sobria* and *A. caviae*, are considered as emerging pathogens by the World Health Organization (WHO) and the United States Environmental Protection Agency (US EPA). This study focused on *A. hydrophila*, and one of the most important findings of this research is that, for the first time, the great ability of *A. hydrophila* to adhere to polyethylene plates was demonstrated. In addition, antibacterial and antibiofilm effect of *A. flaccida* aqueous extract against *A. hydrophila* was also demonstrated.

3.1 Quantification of total biofilm by colony count and crystal violet in polyethylene plates

In assessing the biofilm formation, we used PE as a substrate, which is a polymer used in the manufacture of different medical devices. The chemical composition and hydrophobicity of material can influence microbial adhesion. According to Darouiche (2001) polyethylene is among the materials most propense to microbial adhesion. Additionally, knowing the time of biofilm formation, is possible to optimize the search for molecules able to hinder or block the process of biofilm formation (Rabin et al. 2015). Research about time of biofilm formation is a topic of major medical and social importance since the biofilm makes the microorganism 100-1000-fold higher more resistant to antimicrobial drugs (Hoiby et al. 2010). The capacity to form biofilm is closely associated with the ability to cause infection.

Through the methodologies used in this study it was possible to observe that *A. hydrophila* presents potential activity of biofilm formation in polyethylene plates. In the colony counting method it was possible to quantify the biofilm already from 6 h of incubation time (Figure 1A). In the study performed by Cai and Arias (2017), *A. hydrophila* (ML-09-119) effectively attached and colonized all materials tested (liner, flexible polystyrene plates, and nets). The maximum biofilm formation occurs range 12 - 24 h ($p \leq 0.05$) and after biofilm formation begins reduce, returning to initial value in 96 h when compared of control negative (0 h) ($p \leq 0.05$). Corroborating with results obtained through colony counting method, the evaluation of

biofilm formation through the crystal violet method also demonstrated that maximum biofilm formation occurred within 24 h (Figure 1B), and already in 48 h was observed an intense reduction in biofilm formation that persisted until the end of the evaluation time (96 h).

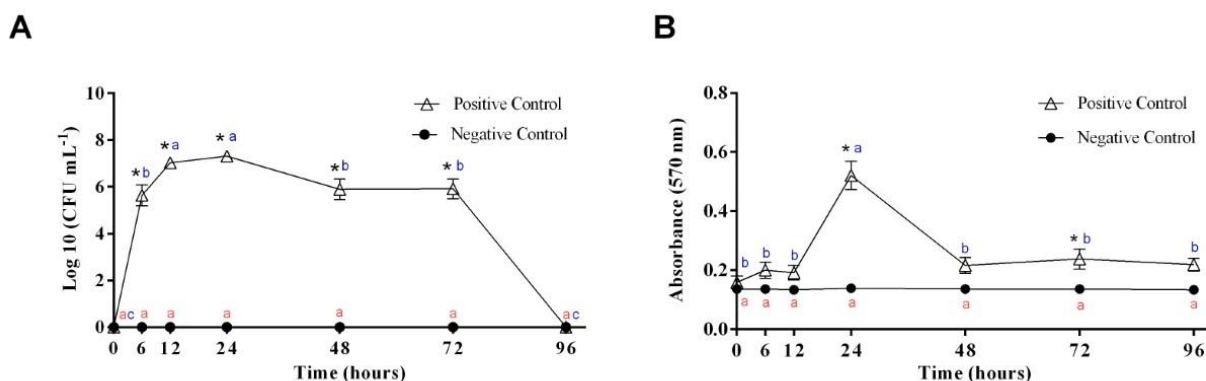


Figure 1 – Quantification of *A. hydrophila* biofilm formed in polyethylene plates by the colony counting (A) and crystal violet method (B) in different times. Was used analysis of variance two-way ANOVA followed by Tukey’s test considering as statistically significant a p -value ≤ 0.05 . Data was expressed as the mean \pm standard deviation. Each point in the curve represents the mean of three independent experiments.

3.2 MIC e MBC of *A. flaccida* aqueous extract

The use of plant derived compounds with antimicrobial action has emerged as an alternative due to the progressive increase in bacterial resistance to traditional drug (Dong et al. 2021; Sutuli et al. 2015). The use of biomaterials in medical clinical is the gateway to the microorganisms causing infection (Nir and Reches 2016). In this context, many scientific researches search in plant extracts and essential oils the discovery of new promising molecules that can act against pathogenic microorganisms (Lahiri et al. 2019; Machado et al. 2020; Machado et al. 2021). The importance of the use of plant derivatives has already been demonstrated due to minimal toxicity to host cells, strong therapeutic potential, and low risk of development of microbial resistance (Nazzaro et al. 2013). Highlighted that this study is the first to assess the antibacterial potential of the *A. flaccida* aqueous extract against *A. hydrophila*.

The antibacterial activity of *A. flaccida* aqueous extract (concentration range of 39 – 20000 $\mu\text{g mL}^{-1}$) was evaluated by testing the MIC and MBC. In this assay the MIC of *A. flaccida* aqueous extract inhibited *A. hydrophila* growth at concentration of 5000 $\mu\text{g mL}^{-1}$. In addition, the MBC demonstrated a bactericidal effect also in the same concentration (5000 $\mu\text{g mL}^{-1}$) against *A. hydrophila* strain. The bactericidal effect demonstrated in the present study are consistent with others researches that demonstrating the antibacterial potential of the plants of

the Asteraceae family (Cazella et al. 2019; Ferreira Farias et al. 2019). The antibacterial effect of the *A. flaccida* extract can be explained due to the presence of bioactive compounds (phenolic compounds) that interfere with nucleic acid and proteins (Cag et al. 2016), since *A. flaccida* aqueous extract is rich in phenolic compounds ($479.23 \pm 21.40 \text{ mg mL}^{-1}$), with 89% of compounds belonged to the flavonoid class, and highlighting the presence of 3-O-methylquercetin (22.5%), quercetin (18%), and luteolin (12%) (Machado et al. 2021).

Others *A. flaccida* studies by our research group showed antimycobacterial effect against fast-growing strains of *Mycobacterium*. The essential oil of *A. flaccida* showed an inhibitory effect against these strains of *Mycobacterium*, while the aqueous extract was bacteriostatic and bactericidal (Machado et al. 2020; Machado et al. 2021). The possible mechanism of action of *A. flaccida* extract need to be unraveled. However, our hypothesis is focused on the inhibition of *Quorum sensing* (QS) responsible for signaling between bacteria, preventing biofilm formation. Since, QS seems to play an essential role in the conversion of microcolonies into biofilm (Lahiri et al. 2019). In addition, other plants products showed antibacterial action, the possible mechanism of action suggested the involves the rupture of the bacterial cytoplasmic membrane due to the lipophilic nature of such substance, this interaction causes a fluidity and permeability increase of the cell membrane, the destruction of the membrane's proteins, inhibition of cell respiration and ion transport alterations (Van Der Heijden et al. 2016).

3.3 Effect of *A. flaccida* aqueous extract on formation and destruction of *A. hydrophila* biofilm

Currently, strategies to prevent biofilm formation involve the development of biofilm inhibiting agents with the aim of preventing the early stages of biofilm formation and preventing microcolony formation (Verderosa et al. 2019). Furthermore, evaluating the ability of an agent to destroy the already formed biofilm is extremely relevant, since until now the formed biofilm is normally removed mechanically (Carmona-Torre et al. 2017). To investigate whether aqueous extract of *A. flaccida* modulate biofilm formation e/or destruction on polyethylene plates were tested *A. hydrophila* strain in presence of different concentrations of *A. flaccida* aqueous extract. The inhibition of biofilm formation evaluated using the crystal violet methodology, showed a decrease of 28.2 % and 62.3 % of biofilm biomass when treated with 1250 $\mu\text{g/mL}$ (1/4 MIC) and 2500 $\mu\text{g/mL}$ (1/2 MIC) (Figure 2A) when compared as positive control. In the evaluation of the destruction of the formed biofilm was observed a decrease of 35.1 % and 38.7% of biofilm biomass when treated with 2500 $\mu\text{g/mL}$ (1/2 MIC) and 5000 $\mu\text{g/mL}$ (MIC=MBC) when compared as positive control (Figure 2B). These results were confirmed by microscopy images by AFM. Different microscopic techniques are employed for the analysis

of biofilms and AFM has been proven to be a reliable tool for studying films embedded in a matrix, such as biofilms (Lopes et al. 2019; Da Silva et al. 2021).

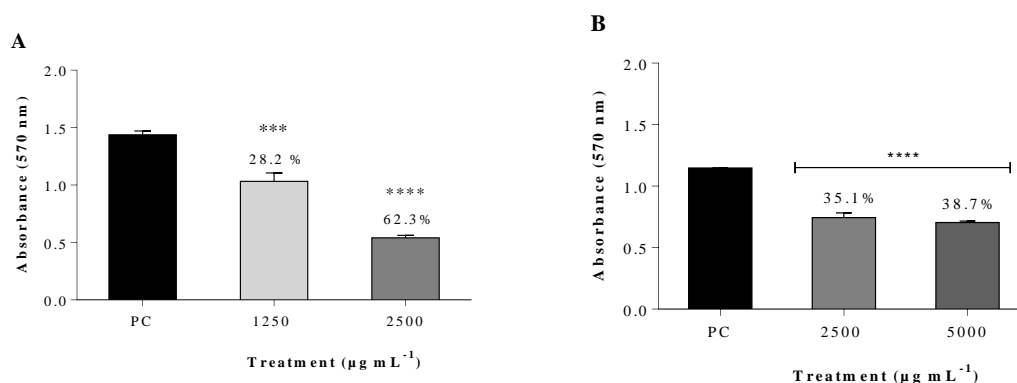


Figure 2 – Effect on inhibition (A) and destruction (B) of *A. hydrophila* biofilm by *A. flaccida* aqueous extract. Was used analysis of variance one-way ANOVA followed by Dunnet’s multiple comparisons test considering values $p < 0.0001$ (****) $p < 0.001$ (***) statistically significant compared with positive control. Data expressed on mean \pm standard deviation. Each point in the curve represents the mean of three independent experiments.

In the AFM evaluation was possible observed the action of the aqueous extract of *A. flaccida* in the inhibition biofilm formation and destruction of the already formed biofilm, and this is a fundamental step in decreasing the pathogenic effect of bacteria (Verderosa et al. 2019). In the Figure 3A, the inhibition in the biofilm formation was analyzed using 1250 $\mu\text{g/mL}$ (1/4 MIC) of the aqueous extract, it is possible to observe that the bacterial are not aggregated, unlike the positive control (Figure 3C), where the bacterial are close to each other indicating biofilm formation in the polyethylene plates. However, in the Figure 3B was observed that in the concentration 2500 $\mu\text{g/mL}$ (1/2 MIC) the aqueous extract was capable of inhibition of the biofilm formation when compared positive control in the time of 24 h. Differently, the analyses of destruction biofilm formed after 48 h, was observed in the concentrations of 2500 $\mu\text{g/mL}$ (Figure 3D) and 5000 $\mu\text{g/mL}$ (Figure 3E) the aqueous extract caused destruction in the biofilm formed when compared with positive control (Figure 3F). These effects of the *A. flaccida* extract can be related to presence of phenolic compounds (Machado et al. 2021), that can interfere with nucleic acid and proteins (Cag et al. 2016). Flavonoids, such as quercetin, inhibited biofilm formation and exopolysaccharides (EPS) production of foodborne bacterial isolates, such a *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa* and *Yersinia enterocolitica* (Ouyang et al.

2016; Cho et al. 2013; Quecán et al. 2019). Others phenolic compounds, such as resveratrol (Dong et al. 2021) and rosmarinic acid (Rama Devi et al. 2016) exhibited a significant inhibition in *Quorum sensing* mediated biofilm formation by *A. hydrophila*. Additionally, rosmarinic acid reduced the number of microcolonies observed in light microscope and confocal laser scanning microscope images (Rama Devi et al. 2016).

This study is in agreement with Rodrigues et al (2020) that reported the presence of phenolic compounds in *Eugenia uniflora* pulpe extract, with a greater reduction in biofilm formation by *A. hydrophila* and in the amounts of polysaccharides and proteins observed by the violet crystal technique. However, extract did not exert anti-biofilm activity against *A. hydrophila*, which may be justified by the possible existence of a resistance mechanism, such as expression of efflux pumps and change in membrane permeability (Cag et al. 2016).

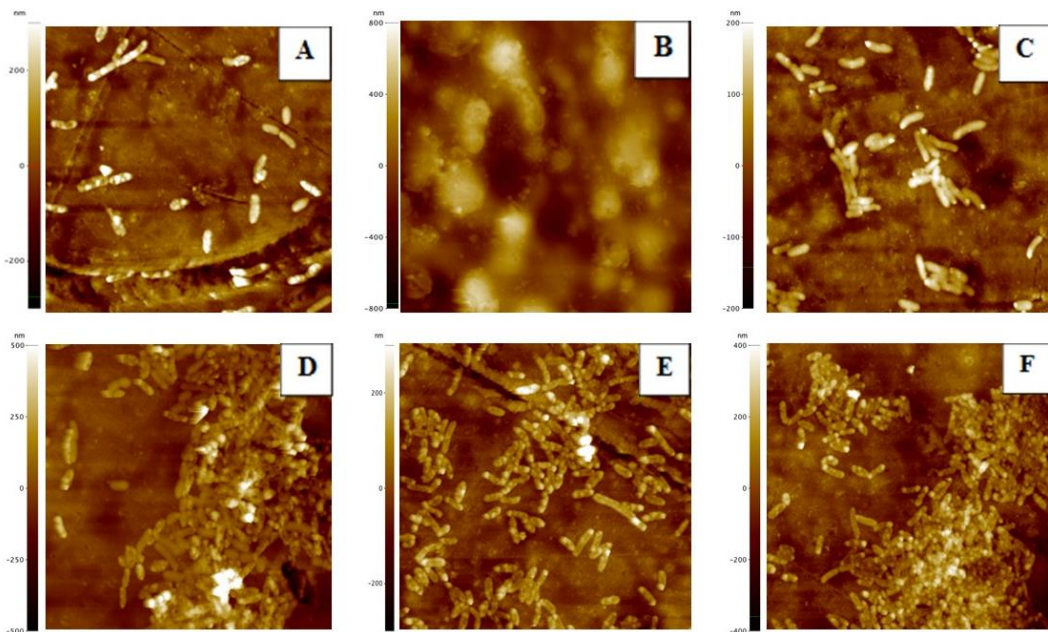


Figure 3 – Atomic force microscopy (AFM) representative images of biofilm formed by *A. hydrophila* in the presence of different concentrations of *A. flaccida* aqueous extract. Biofilm inhibition effects were evaluated in 24 h and destruction of biofilm formed was evaluated in 48 h. The concentration of *A. flaccida* aqueous extract evaluated to inhibition were 1250 $\mu\text{g/mL}$ (A) and 2500 $\mu\text{g/mL}$ (B); and to destruction were 2500 $\mu\text{g/mL}$ (D) and 5000 $\mu\text{g/mL}$ (E). Positive control (C) and positive control (F) in polyethylene plate in time of 24 h and 48 h, respectively.

Conclusion

The findings of the present study showed that *A. hydrophila* can form biofilm in polyethylene plate and the greatest biofilm formation occurred within 12 - 24 h after incubation. This is the first research that to demonstrate the antimicrobial and antibiofilm potential of the

A. flaccida aqueous extract, and from that more research is needed to clarify the mechanisms action the *A. flaccida* aqueous extract on the genetic and physiological factors associated with biofilm formation.

Acknowledgements

This work was supported by the Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico – CNPq (grant numbers 310360/2019-6); and by the Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – CAPES (grant numbers 88882.428189/2019-01)); and by the Fundação de Amparo à Pesquisa no Rio Grande do Sul – FAPERGS (grant numbers 17/2551-0001).

Conflict of interest

The authors declare that they have no conflict of interest.

Author contributions

All authors contributed effectively and intellectually to this work and all approve the publication.

References

- Alaniz, F. S. et al. 2010. Derivated products from *Achyrocline satureioides* and *Arnica montana*, with immunomodulating effects. *Mol. Med. Chem.* 20: 121-124.
- Alfonso, J., Rodriguez-Morales and Diana, M. Castañeda-Hernández. 2019. Bacteria: Aeromonas. Reference Module in Food Sciences.
- Alvarez, B. et al. 2006. Uma mutação em *Flavobacterium psychrophilum tlpB* inibe a motilidade de deslizamento e induz a formação de biofilme. *Appl. Environ. Microbiol.* 72: 4044 – 4053.
- Borges, A. Saavedra, M. J.; Simões, M. 2012. The activity of ferulic and gallic acids in biofilm prevention and control of pathogenic bacteria. *Biofouling.* 28: 755-767.
- Cabello, F. C.; Godfrey, H. P.; Tomova, A.; Ivanova, L.; Dölz, H.; Millanao, A.; Buschmann, A. H. Antimicrobial use in aquaculture reexamined: Its relevance to antimicrobial resistance and to animal and human health. *Environ. Microbiol.* 2013, 15 (7), 1917–42.
- Cag, Y. et al. 2016. Resistance mechanisms, *Ann. Transl. Med.* 4: 326.
- Cai, W. and Arias, C. R. 2017. Biofilm formation on aquaculture substrates by selected bacterial fish pathogens. *J. Aquat. Anim. Health.* 29: 95-104.
- Carmona-Torre F, Yuste JR, Castejon S, et al. Catheter-related bloodstream infections in patients with oncohaematological malignancies. *PubMed PMID: 28134110 Lancet Infect Dis.* 2017;172:139– 140.
- Cazella, L. N. et al. 2019. Antimicrobial activity of essential oil of *Baccharis dracunculifolia* DC (Asteraceae) aerial parts at flowering period. *Front. Plant Sci.* 10: 27.
- CLSI Clinical and Laboratory Standards Institute. Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria That Grow Aerobically; Approved Standard – Ninth Editio 32th

- informational supplement. M07 – A9. Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne, PA, 2012.
- DAFERERA, Dimitra J.; ZIOGAS, Basil N.; POLISSIOU, Moschos G. The effectiveness of plant essential oils on the growth of *Botrytis cinerea*, *Fusarium* sp. and *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*. *Crop protection*, v. 22, n. 1, p. 39-44, 2003.
- Da Silva, E. G. et al. 2021. *In Vitro* Antimicrobial and Antibiofilm Activity of S-(-)-Limonene and R-(+)-Limonene against Fish Bacteria. *Fishes*. 6: 32.
- Darouiche, R. O. et al. 2009. Antimicrobial and antibiofilm efficacy of triclosan and DispersinB® combination. *J Antimicrob Chemother*. 64: 88-93.
- Deng, Y.T., Wu, Y.L., Tan, A.P., Huang, Y.P., Jiang, L., Xue, H.J., Wang, W.L., Luo, L., Zhao, F., 2013. Analysis of antimicrobial resistance genes in *Aeromonas* spp. isolated from cultured freshwater animals in China. *Microb. Drug Resist*.
- Dias, M.K.R., et al. 2016. Lethal dose and clinical signs of *Aeromonas hydrophila* in *Arapaima gigas* (Arapaimidae), the giant fish from Amazon, *Vet. Microbiol*. 188: 12-15.
- Dong, J et al. 2021. Resveratrol influences the pathogenesis of *Aeromonas hydrophila* by inhibiting production of aerolysin and biofilm. *Food Control*. 126: 108083.
- El-nahhal, Y. et al. 2016. Toxicological data of some antibiotics and pesticides to fish, mosquitoes, cyanobacterial mats and to plants. *Data in Brief*. 6: 871-880.
- FABRICANT, Daniel S.; FARNSWORTH, Norman R. The value of plants used in traditional medicine for drug discovery. *Environmental health perspectives*, v. 109, n. suppl 1, p. 69-75, 2001.
- Flemming HC, et al. Biofilms: an emergent form of bacterial life. *Nat Rev Microbiol*. 2016; 14:563–575.
- Ferreira Farias, A. L. et al. 2019. Chemical characterization, antioxidant, cytotoxic and microbiological activities of the essential oil of leaf of *Tithonia diversifolia* (Hemsl) A. Gray (Asteraceae). *Pharmaceuticals*. 12: 34.
- Giri, S.S. Sen, C. Chi, H.Y. Kim, S. Yun, S.C. Park, V. Sukumaran, Effect of cellular products of potential probiotic bacteria on the immune response of *Labeo rohita* and susceptibility to *Aeromonas hydrophila* infection, *Fish. Shellfish Immunol*. 46 (2015) 716e722.
- Grenni, P. et al. 2018. Ecological effects of antibiotics on natural ecosystems: a review. *Microchem. J*. 136:25- 39.
- Hieronymus, J., 1882. Plantas Diafóricas – Flora Argentina. *Bol. Acad. Nac. Cienc. Cordoba* 4, 199–201.
- Hoiby, N. et al. 2010. Antibiotic resistance of bacterial biofilms. *Int J Antimicrob. Agents*. 35(4): 322–332.
- Huang, M.Y. et al. 2015. Effects of dietary levan on growth performance, nonspecific immunity, pathogen resistance and body composition of orange-spotted grouper (*Epinephelus coioides* H.), *Aquacult. Res*. 46 (2015) 2752e2767.
- Lahiri, D. et al. 2019. Elucidating the effect of anti-biofilm activity of bioactive compounds extracted from plants. *J. Biosci*. 44:1-19.
- Laxminarayan, R.; Duse, A.; Wattal, C.; Zaidi, A. K.; Wertheim, H. F.; Sumpradit, N.; Vlieghe, E.; Hara, G. L.; Gould, I. M.; Goossens, H. Antibiotic resistance – The need for global solutions. *Lancet Infect. Dis*. 2013, 13 (12), 1057–98.
- Lopes, L. Q. S. et al. 2019. Characterization and anti-biofilm activity of glycerol monolaurate nanocapsules against *Pseudomonas aeruginosa*. *Microb. Pathog*. 130: 178-185.
- Machado, V. S. et al. 2021. Antimycobacterial activity of *Achyrocline flaccida* (Asteraceae) aqueous extract from Southern Brazil. *Nat Prod Res*. 2021; 27: 1-5.
- Machado, V. S. et al. 2020. *Achyrocline flaccida* essential oil from Brazil: phytochemical

- composition, genotoxicity, protective effects on *Caenorhabditis elegans*, and antimycobacterial activity. *Nat Prod Res.* 2020; 0:1–5.
- Nazzaro, F et al. (2013). Effect of essential oils on pathogenic bacteria. *Pharmaceuticals.* 6: 1451-1474.
- Ottaviani, D., Parlani, C., Citterio, B., Masini, L., Leoni, F., Canonico, C., Sabatini, L., Bruscolini, F., Pianetti, A., 2011. Putative virulence properties of *Aeromonas* strains isolated from food, environmental and clinical sources in Italy: a comparative study. *Int.J. Food Microbiol.* 144, 538-545.
- Paccard, E., 1905. *Plantas medicinales de la Republica Oriental y Argentina.* A. Ramos, Montevideo, p. 78.
- Pandey, P. K., V. Bharti, and K. Kumar. 2014. Biofilm in aquaculture production. *African Journal of Microbiology Research* 8:1434–1443.
- Parodi, D., 1979. *Enciclopedia Arg. de Agricultura y Jardinería.* ACME, Buenos Aires, p. 80.
- Rabin N. et al. 2015. Biofilm formation mechanisms and targets for developing antibiofilm agents. *Future Med Chem.* 17:493–512.
- Rama Devi, K. et a. 2016. *In vitro* and *in vivo* efficacy of rosmarinic acid on quorum sensing mediated biofilm formation and virulence factor production in *Aeromonas hydrophila*. *Biofouling.* 32: 1171-1183.
- Rodrigues, A. C. et al. 2020. Phenolic extract of *Eugenia uniflora* L. and furanone reduce biofilm formation by *Serratia liquefaciens* and increase its susceptibility to antimicrobials. *Biofouling.* 36: 1031-1048.
- Rosa, J. et al. 2017. Variability and population genetic structure in *Achyrocline flaccida* (Weinm.) DC., a species with high value in folk medicine in South America. *PloS one,* 12: 0183533.
- Rosso, F. et al. 2019. Emerging carbapenem-resistant *Aeromonas* spp. infections in Cali, Colombia. *Braz J Infect Dis.* 23: 336-342.
- Sinha, S. D. et al. 2017. Evaluation of the role of substrate and albumin on *Pseudomonas aeruginosa* biofilm morphology through FESEM and FTIR studies on polymeric biomaterials. *Progress in Biomaterials.* 6: 27–38.
- Sudheesh PS, Al-Ghabshi A, Al-Mazrooei N, Al-Habsi S. 2012. Comparative pathogenomics of bacteria causing infectious diseases in fish. *Int J Evol Biol.* Article
- Suttili, F.J. et al. 2015. Plant essential oils against *Aeromonas hydrophila*: *in vitro* activity and their use in experimentally infected fish, *J. Appl. Microbiol.* 119: 47-54.
- Stolz, E.D. et al. 2014. Survey of plants popularly used for pain relief in Rio Grande do Sul, southern Brazil. *Rev. Bras. Farmacogn.*24: 185-196.
- United States Environmental Protection Agency, *Method 1605. Aeromonas in Finished Water by Membrane filtration using Ampicillin-Dextrin Agar with Vancomycin (ADA-V)*, United States Environmental Protection Agency, Washington, DC, USA, 2001
- Van Der Heijden, J. 2016. Exploring the redox balance inside gram-negative bacteria with redox-sensitive GFP. *Free Radic Biol Med.* 91:34–44.
- Verderosa, A. D. et al. 2019. Bacterial biofilm eradication agents: a current review. *Front. Chem.* 7: 824.
- Yarahmadi, P. et al. 2016. Protective effects of the prebiotic on the immunological indicators of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) infected with *Aeromonas hydrophila*, *Fish Shellfish Immunol.* 54: 589-597.
- Wang, C.; Gu, X.; Zhang, S.; Wang, P.; Guo, C.; Gu, J.; Hou, J. Characterization of antibiotic-resistance genes in antibiotic resistant *Escherichia coli* isolates from a lake. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 2013, 65 (4), 635–41.

6 DISCUSSÃO GERAL

Mesmo com o avanço das tecnologias as plantas continuam sendo uma importante opção na busca de moléculas com potencial atividade antioxidante, anti-inflamatória e antimicrobiana. Esse fato, é de extrema importância sabendo da evolução dos microrganismos e seus mecanismos de resistência a terapia antimicrobiana existente. Com o objetivo de conter a evolução desses microrganismos muitas pesquisas são necessárias. Nesse contexto, nossa pesquisa revelou novos benefícios dessa planta muito utilizada no Sul do Brasil, denominada *A. flaccida*. Essa espécie é muito confundida com a espécie *A. satureioides*, devido suas semelhanças estruturais e morfológicas. Poucos relatos foram encontrados na literatura sobre o óleo essencial e o extrato de *A. flaccida*.

A primeira parte dessa pesquisa foi focada na caracterização, toxicidade e atividade antioxidante e antimicrobiana tanto do óleo essencial como do extrato de *A. flaccida*. Desta forma, o óleo essencial foi analisado por cromatografia gasosa e foram demonstrados 24 compostos, representando 93,0% do total, sendo os compostos majoritários o α -pineno (41,10%) e o cariofileno (30,52%). Sabendo da semelhança climática do Sul do Brasil e da Argentina, foi possível fazer uma comparação com os nossos resultados. A análise do óleo essencial de *A. flaccida* coletado na Argentina, também demonstrou que o óleo essencial tem como compostos majoritários o α -pineno e o β -cariofileno. O extrato aquoso de *A. flaccida* foi analisado por cromatografia líquida de alta eficiência e demonstrou que 89% dos compostos pertencem a classe dos flavonóides, sendo os compostos majoritário o 3-*O*-metilquercetina (22.5%), quercetina (18%) e luteolina (12%). Esse foi o primeiro estudo publicado sobre o extrato aquoso de *A. flaccida* da região Sul do Brasil (MACHADO et al. 2021).

Nesse contexto, sabendo da composição fitoquímica do óleo essencial e extrato observamos os possíveis efeitos de toxicidade *in vitro* (PBMCs) e *in vivo* (*C. elegans*) que esses compostos possam provocar para o organismo humano. As concentrações avaliadas dos 2 compostos não provocaram efeitos de toxicidade. Baseado na análise da literatura, os compostos majoritários presentes no óleo essencial (α -pineno, cariofileno entre outros) apresentam uma ampla gama de concentrações seguras para uso (DI SOTTO et al. 2008; MOLINA-JASSO et al. 2009), o mesmo foi observado para o extrato aquoso. Desta forma, foi possível ampliar as expectativas iniciais e dar continuidade as metodologias.

Muitas plantas apresentam em sua composição moléculas capazes de reduzir as espécies reativas de oxigênio em nosso organismo, causando o chamado efeito antioxidante. As espécies

reativas de oxigênio quando em desequilíbrio promovem em nosso organismo diferentes patologias. Contamos com a análise *in vivo* (*C. elegans*) para observar o efeito do óleo essencial e o extrato no equilíbrio das espécies reativas de oxigênio em nosso organismo. De fato, tanto o óleo essencial como o extrato foram capazes de reduzir a produção de espécies reativas de oxigênio nas diferentes concentrações testadas, além de reverter os efeitos provocados pelo juglone (pro-oxidante). Sendo assim, o bom resultado pode ser justificado pela presença de numerosas moléculas bioativas presentes no óleo essencial e extrato (CALLEJA et al. 2013).

Além do potencial efeito antioxidante e pouco ou nenhum efeito tóxico a pesquisa com plantas torna-se ainda mais relevante. Atualmente, com o crescente aumento da resistência bacteriana a busca por novas moléculas eficazes e sem efeitos colaterais amplia a luta contra as diversas complicações provocada pelos microrganismos. Os microrganismos apresentam capacidade de evoluir rapidamente as adversidades, afetando milhões de pacientes em todo o mundo, aumentando a morbidade e mortalidade. Além de causar perdas financeiras significativas para o sistema de saúde (ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE, 2011). Neste contexto, analisamos o efeito do óleo essencial frente a micobactérias de crescimento rápido (*M. massiliensis*, *M. abscessus* e *M. fortuitum*). O óleo essencial foi capaz de inibir o crescimento das três cepas em concentrações que variaram de 3000 e 1500 $\mu\text{g mL}^{-1}$. Diferente dos resultados encontrados para o extrato aquoso, onde o mesmo apresentou efeito bacteriostático e bactericida frente as três cepas na concentração de 1560 $\mu\text{g mL}^{-1}$. O bom efeito apresentado pelo óleo essencial e extrato decorre do fato da rica diversidade de compostos bioativos capazes de causar uma cascata de reações nas células bacterianas. O efeito inibitório no crescimento das micobactérias apresentado pelo óleo essencial pode ser explicado por meio da permeabilidade e des-polarização da membrana citoplasmática, ocorrendo redução na geração de energia e consequentemente menor crescimento micobacteriano (LAHIRI et al. 2019). Os compostos hidrofílicos, como os flavonóides, são capazes de penetrar através dos canais de porinas presente na parede celular das micobactérias promovendo a morte (FERNÁNDEZ e HANCOCK, 2012).

Tendo em vista a efetiva ação antimicobacteriana do extrato, buscamos ampliar nossa pesquisa e avaliar a possível ação anti-*Pythium insidiosum* desse composto. *P. insidiosum* é um oomiceto aquático causador da pitiose em humanos e animais. Até o momento, as alternativas para tratamento da pitiose são agressiva e não apresentam 100% de cura. Deste modo, utilizamos 19 isolados de *P. insidiosum* e avaliamos o efeito do extrato na inibição e/ou morte desse oomiceto. Indo de acordo com os achados apresentados nas Short Communications I e II, o extrato de *A. flaccida* foi promissor na inibição do crescimento de todas as cepas testadas de *P. insidiosum* em concentrações que variaram entre 24 – 195 $\mu\text{g mL}^{-1}$ (MIC 50%), 48 - 390 μg

mL⁻¹ (MIC 90%), e 97 - 781 µg mL⁻¹ (MIC 100%). Ao mesmo tempo que foi capaz de promover o efeito oomicida nas concentrações de 97 – 1562 µg mL⁻¹. Nossos resultados estão de acordo com Araújo et al. (2016) que reportaram os efeitos dos extratos de própolis e geoprópolis produzidos por *Melipona compressipes fasciculata* na inibição de isolados de *P. insidiosum* em concentrações que variaram de 1000 a 3400 µg mL⁻¹. Para explicar a ação anti-*P. insidiosum* os autores avaliaram o possível mecanismo de ação do extrato de própolis e geoprópolis usando o modelo experimental de *Saccharomyces cerevisiae*. Os resultados demonstraram que a morte do oomiceto foi por mecanismos relacionados a apoptose e necrose secundária. Adicionalmente, demonstraram que a própolis induz o acúmulo de espécies reativas de oxigênio durante a apoptose. Nesse sentido, o possível mecanismo de ação do extrato de *A. flaccida* pode estar relacionado com a apoptose seguida de necrose. Para complementar esses achados utilizamos a microscopia eletrônica de varredura, onde foi possível visualizar o aspecto rugoso e sem brilho das hifas tratadas com o extrato, diferente dos achados sem tratamento, onde as hifas apresentam aspecto brilhoso e túrgidas. Nesse contexto, outros autores relatam o efeito anti-*P. insidiosum* dos óleos essenciais de *Origanum majorana*, *Mentha piperita*, *Rosmarinus officinalis*, e *Melaleuca alternifolia* (FONSECA et al. 2015; ARAÚJO et al. 2016; TROLEZI et al. 2017).

No entanto, sabendo da evolução dos microrganismos e seus vários mecanismos de resistência, existe um desses mecanismos que vem sendo muito estudado e pesquisado que é o biofilme. O biofilme nada mais é do que uma forma de resistência dos microrganismos e é considerado um importante problema de saúde pública. O principal agravante das complicações causadas por microrganismo consiste do uso de dispositivos médicos como cateteres, tubos endotraqueais, próteses dentre outros. Esses dispositivos podem ser colonizados por diferentes microrganismos capazes de se aderir a esses materiais organizando-se em comunidades multicelulares chamadas biofilmes (DAVIES, 2003). No biofilme, os microrganismos se tornam mais resistentes a ação dos fármacos antimicrobianos, conseqüentemente, dificultando o tratamento. A bactéria *A. hydrophila*, é responsável por causar infecções em humanos especialmente em crianças e pacientes imunocomprometidos (DIAS et al. 2016). A patogenicidade dessa bactéria está relacionada a produção de múltiplos fatores de virulência, sendo o principal deles o biofilme. Até o momento, não existe um tratamento capaz de remover totalmente o biofilme formado em uma superfície. Se adentrarmos na clínica médica, a formação de biofilme em próteses e cateteres compromete a vida do paciente, uma vez que para remover o biofilme só é possível na maioria das vezes através da remoção mecânica. Nesse contexto, sabendo da importância de conter complicações causadas pelos microrganismos e seus mecanismos de resistência, avaliamos o efeito antimicrobiano e antibiofilme do extrato frente a *A. hydrophila*.

Em nossa pesquisa foi possível observar que a formação do biofilme de *A. hydrophila* em placas de polietileno de alta densidade ocorre nos tempos de 12 a 24 horas. Nosso estudo está de acordo com Cai et al. (2017) que relataram que *A. hydrophila* (ML-09-119) efetivamente aderiu e colonizou os materiais testados como tubo de cloreto de polivinila (PVC), forro e rede. Ademais, avaliamos o efeito antimicrobiano do extrato de *A. flaccida* pelo método de microdiluição em caldo e foi possível observar o efeito bacteriostático e bactericida frente a *A. hydrophila* na concentração de 5000 $\mu\text{g mL}^{-1}$. Esse resultado é de extrema importância sabendo da mínima toxicidade dos derivados de plantas para as células humanas, forte efeito terapêutico e baixo risco de desenvolvimento de resistência (NAZZARO et al. 2013). Nesse contexto, o extrato foi capaz de inibir a formação do biofilme em 62,3% na concentração de 2500 $\mu\text{g/mL}$ (1/2 MIC), além de destruir 38,7% do biofilme formado na concentração de 5000 $\mu\text{g/mL}$ (MIC). Esses resultados podem ser observados nas imagens de microscopia de força atômica. O efeito antibacteriano do extrato pode ser justificado devido a presença de compostos bioativos que interferem na produção de ácidos nucleicos e proteínas (CAG et al. 2016). Flavonóides como quercetina, inibem a formação de biofilme e exopolissacarídeos de isolados bacterianos de origem alimentar, como *Klebsiella pneumoniae*, *P. aeruginosa* e *Yersinia enterocolitica* (CHO et al. 2013; OUYANG et al. 2016; QUECÁN et al. 2019). O crescente avanço da resistência bacteriana responsável por causar anualmente milhões de mortes em todo o mundo (O'NEILL, 2014) merece maior atenção.

Frente a todos os resultados apresentados nessa tese, são de interesse suficiente para darmos continuidade às investigações, e desvendar os possíveis mecanismos de ação do óleo e do extrato. A difícil extração do óleo essencial não impede o possível uso do óleo essencial para o tratamento de diversas patologias causadas por microrganismos, uma vez que, a engenharia química evolui dia a dia. Conhecendo os compostos que apresentam atividade biológica novos horizontes se abrem para a possível síntese desses compostos. O uso do extrato aquoso além de ser livre de diluentes com possível atividade biológica é de fácil reprodutibilidade, uma pequena quantidade da planta rende uma quantidade suficiente de extrato para uso. Nesse sentido, conhecendo os dados aqui apresentados frente a diferentes microrganismos amplia nossa ansiedade por novos estudos complementares pensando na formulação de um possível medicamento fitoterápico, livre de efeitos colaterais e de baixo custo.

7 CONCLUSÃO

Considerando os objetivos propostos nessa tese, foi possível concluir através das análises experimentais que:

- O óleo essencial e extrato aquoso de *A. flaccida* apresentam composição fitoquímica rica em compostos bioativos e com potencial ação terapêutica já comprovada em outras espécies da família Asteraceae;
- O óleo essencial não apresentou efeitos genotóxicos na análise *in vitro* com células polimorfonucleares de sangue periférico;
- O efeito antioxidante do óleo essencial foi avaliado em *C. elegans*, demonstrando o efeito capaz de inibir a produção de espécies reativas de oxigênio, além de reestabelecer o equilíbrio redox;
- O óleo essencial apresentou efeito bacteriostático frente a três espécies de *Mycobacterium*;
- O extrato aquoso não apresentou toxicidade aguda quando analisado *in vivo* utilizando *C. elegans*, nos mostrando que de forma sistêmica é possível o uso dessa planta sem causar toxicidade para o organismo humano;
- O extrato também apresentou potencial efeito antioxidante, conseguindo reestabelecer o equilíbrio oxidativo, também foi capaz de reverter os efeitos provocados pelo juglone (pro-oxidante);
- O extrato apresentou efeitos bacteriostáticos e bactericidas frente as cepas de micobactérias;
- O extrato aquoso apresentou efeito oomicida frente aos 19 isolados de *P. insidiosum* testados;
- Através dos ensaios de cristal violeta e contagem de colônias foi possível observar que o pico de formação de biofilme de *A. hydrophila* ocorre nos tempos de 12 a 24 horas;
- Concentrações sub-inibitórias foram capazes de inibir a produção de biofilme de *A. hydrophila*;
- Concentrações de CIM usada do extrato de *A. flaccida* foi capaz de destruir parcialmente o biofilme formado;
- Imagens realizadas por MFA mostram a capacidade de formação de biofilme por *A. hydrophila* em placas de polietileno de alta densidade, e do mesmo modo, demonstram a efetividade do extrato em inibir a formação do biofilme.

Sendo assim, essa tese apresentou dados de extrema relevância levando em consideração a novidade científica do uso de uma planta de ampla distribuição mundial e de fácil acesso e uso pela população. Apresentamos dados sobre a composição química do óleo e do extrato aquoso da *A. flaccida* juntamente com dados de extrema relevância relacionados a atividade de toxicidade e atividade antioxidante usando testes *in vitro* e *in vivo* promovendo maior reprodutibilidade e confiança para nossos resultados. Ademais, testamos os efeitos do extrato frente a

microrganismos com características totalmente diferenciadas, obtivemos resultados excelentes se tratando de um composto natural. Nesse sentido, podemos concluir que nosso estudo abre o leque para a descoberta de um medicamento fitoterápico que pode revolucionar a área da microbiologia, promovendo melhor qualidade de vida e economia para a população.

8 PERSPECTIVAS

Por se tratar de uma novidade científica proveniente de uma planta de fácil acesso e de amplo uso popular, algumas perspectivas surgem:

- Realizar estudos *in vitro* avaliando a atividade do extrato aquoso de *A. flaccida* em associação com outros fármacos no tratamento das micobacterioses, biofilme e frente ao oomiceto *P. insidiosum*;
- Avaliar o uso tópico do extrato aquoso e do óleo de *A. flaccida*;
- Avaliar o possível mecanismo de ação do óleo e do extrato aquoso com a finalidade de criar um possível medicamento fitoterápico;
- Sabendo da pouca estabilidade do óleo essencial, buscar mecanismo de nanoencapsulamento para promover melhor estabilidade e potencializar o efeito terapêutico;
- Avaliar a atividade anti-inflamatória do extrato aquoso de *A. flaccida* uma vez que a literatura relata o forte efeito anti-inflamatório de plantas da família Asteraceae.

9 REFERÊNCIAS

- ABDELHAMED, Hossam et al. Characterization of histopathological and ultrastructural changes in channel catfish experimentally infected with virulent *Aeromonas hydrophila*. **Frontiers in microbiology**, v. 8, p. 1519, 2017.
- ACHIKA, Jonathan I. et al. A review on the phytoconstituents and related medicinal properties of plants in the Asteraceae family. **International Organization of Scientific Research Journal of Applied Chemistry**, v. 7, n. 8, p. 1-8, 2014.
- Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) – Infecções por *Mycobacterium abscessus*. Diagnóstico e tratamento. **Informe Técnico 1**. Gerência Geral de Tecnologia em Serviços de Saúde. 2007, 8p.
- Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) – Casos de infecção por Micobactérias Não-tuberculosas notificados. **Rede Nacional de Investigação de Surtos e Eventos Adversos em Serviços de Saúde (RENISS)**. 2009.
- ALVES, Everton Giovanni et al. Estudo comparativo de técnicas de *screening* para avaliação da atividade antibacteriana de extratos brutos de espécies vegetais e de substâncias puras. **Química nova**, v. 31, n. 5, p. 1224-1229, 2008.
- ALEXOPOULOS, C. J.; MIMS, C. W.; BLACKWELL, M. *Phylum oomycota*. **Introductory mycology**, v. 4, p. 683-737, 1996.
- AGARNETT, James; MATTHEWS, Steve. Interactions in bacterial biofilm development: a structural perspective. **Current Protein and Peptide Science**, v. 13, n. 8, p. 739-755, 2012.
- ALGBURI, Ammar et al. Control of biofilm formation: antibiotics and beyond. **Appl. Environ. Microbiol.**, v. 83, n. 3, p. e02508-16, 2017.
- ÁLVAREZ, José Cardona; VILORIA, Marlene Vargas; AYOLA, Sandra Perdomo. Pitiose cutânea em equinos: uma revisão. **Revista CES Medicina Veterinaria y Zootecnia**, v. 8, n. 1, p. 58-67, 2013.
- ALPERI, A.; FIGUERAS, M. J. Human isolates of *Aeromonas* possess Shiga toxin genes (*stx1* and *stx2*) highly similar to the most virulent gene variants of *Escherichia coli*. **Clinical microbiology and infection**, v. 16, n. 10, p. 1563-1567, 2010.
- ARTINI, M. et al. Bacterial biofilm formation inhibitory activity revealed for plant derived natural compounds. **Bioorganic & medicinal chemistry**, v. 20, n. 2, p. 920-926, 2012.
- ASH, Ronald J.; MAUCK, Brena; MORGAN, Melissa. Antibiotic resistance of gram-negative bacteria in rivers, United States. **Emerging infectious diseases**, v. 8, n. 7, p. 713, 2002.
- AUERBACH, Ilene D. et al. Physical morphology and surface properties of unsaturated *Pseudomonas putida* biofilms. **Journal of bacteriology**, v. 182, n. 13, p. 3809-3815, 2000.
- BALDISSEROTTO, Bernardo; RADÜNZ NETO, Joao. **Criacao de Jundiá**. 2004.

- BAUMGARTNER, Wes A.; FORD, Lorelei; HANSON, Larry. Lesions caused by virulent *Aeromonas hydrophila* in farmed catfish (*Ictalurus punctatus* and *I. punctatus* × *I. furcatus*) in Mississippi. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, v. 29, n. 5, p. 747-751, 2017.
- BATISH, Daizy R. et al. Eucalyptus essential oil as a natural pesticide. **Forest Ecology and Management**, v. 256, n. 12, p. 2166-2174, 2008.
- BAKER, Matthew R.; GOBUSH, Kathleen S.; VYNNE, Carly H. Review of factors influencing stress hormones in fish and wildlife. **Journal for Nature Conservation**, v. 21, n. 5, p. 309-318, 2013.
- BERRYESSA, N. A. et al. Gastrointestinal pythiosis in 10 dogs from California. **Journal of veterinary internal medicine**, v. 22, n. 4, p. 1065-1069, 2008.
- BIESAGA, Magdalena. Influence of extraction methods on stability of flavonoids. **Journal of Chromatography A**, v. 1218, n. 18, p. 2505-2512, 2011.
- BINNING, G.; QUATE, C. F.; GERBER, C. Atomic force microscope. *Physical Review Letters*. 1986.
- BOBEREK, Jaroslaw M.; STACH, Jem; GOOD, Liam. Genetic evidence for inhibition of bacterial division protein FtsZ by berberine. **PloS one**, v. 5, n. 10, 2010.
- BÖHL, M. et al. Identification of actin as quercetin-binding protein: an approach to identify target molecules for specific ligands. **Analytical biochemistry**, v. 346, n. 2, p. 295-299, 2005.
- BOND, William J.; PARR, Catherine L. Beyond the forest edge: ecology, diversity and conservation of the grassy biomes. **Biological conservation**, v. 143, n. 10, p. 2395-2404, 2010.
- BOSCO, Sandra de Moraes Gimenes et al. Human pythiosis, Brazil. **Emerging infectious diseases**, v. 11, n. 5, p. 715, 2005.
- BOTTON, Sonia A. et al. Identification of *Pythium insidiosum* by nested PCR in cutaneous lesions of Brazilian horses and rabbits. **Current microbiology**, v. 62, n. 4, p. 1225-1229, 2011.
- BRAGA, Pier Carlo; RICCI, Davide. Atomic force microscopy: application to investigation of *Escherichia coli* morphology before and after exposure to cefodizime. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 42, n. 1, p. 18-22, 1998.
- BROWN, Tina A.; GROOTERS, Amy M.; HOSGOOD, Giselle L. In vitro susceptibility of *Pythium insidiosum* and a *Lagenidium* sp to itraconazole, posaconazole, voriconazole, terbinafine, caspofungin, and mefenoxam. **American journal of veterinary research**, v. 69, n. 11, p. 1463-1468, 2008.
- BROWN, Mindy G.; BALKWILL, David L. Antibiotic resistance in bacteria isolated from the deep terrestrial subsurface. **Microbial Ecology**, v. 57, n. 3, p. 484, 2009.
- BUERGELT, Claus; POWE, Joshua; WHITE, Tamara. Abdominal pythiosis in a Bengal tiger (*Panthera tigris tigris*). **Journal of Zoo and Wildlife Medicine**, v. 37, n. 2, p. 186-189, 2006.

BURT, Sara. Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods—a review. **International journal of food microbiology**, v. 94, n. 3, p. 223-253, 2004.

BROUSSALIS, A. M. et al. Phenolic constituents of four *Achyrocline* species. **Biochemical systematics and ecology**, v. 16, n. 4, p. 401-402, 1988.

CARPENTIER, Brigitte; CERF, O. Biofilms and their consequences, with particular reference to hygiene in the food industry. **Journal of applied bacteriology**, v. 75, n. 6, p. 499-511, 1993.

CARVALHO, ANA CeCIIIA BezeRRA et al. Aspectos da legislação no controle dos medicamentos fitoterápicos. **T&C Amazônia**, v. 5, n. 11, p. 26-32, 2007.

COLLINSON, Emma J. et al. The yeast homolog of heme oxygenase-1 affords cellular antioxidant protection via the transcriptional regulation of known antioxidant genes. **Journal of Biological Chemistry**, v. 286, n. 3, p. 2205-2214, 2011.

COLPO, Ana C. et al. Yerba mate (*Ilex paraguariensis* St. Hill.)-based beverages: How successive extraction influences the extract composition and its capacity to chelate iron and scavenge free radicals. **Food chemistry**, v. 209, p. 185-195, 2016.

COMIN, Vanessa M. et al. Influence of *Melaleuca alternifolia* oil nanoparticles on aspects of *Pseudomonas aeruginosa* biofilm. **Microbial pathogenesis**, v. 93, p. 120-125, 2016.

CONSELHO REGIONAL DE FARMÁCIA DO ESTADO DE SÃO PAULO— Cartilha de Plantas Medicinais e fitoterápicos. 4ª ed., 2019

CORTÉS, Maria Esperanza; BONILLA, Jessika Consuegra; SINISTERRA, Ruben Dario. Biofilm formation, control and novel strategies for eradication. **Sci Against Microbial Pathog Commun Curr Res Technol Adv**, v. 2, p. 896-905, 2011.

CHEN, X. et al. Recognition of protein adsorption onto polymer surfaces by scanning force microscopy and probe— surface adhesion measurements with protein-coated probes. **Langmuir**, v. 13, n. 15, p. 4106-4111, 1997.

CHO, Eun Hye et al. Drug susceptibility patterns of *Mycobacterium abscessus* and *Mycobacterium massiliense* isolated from respiratory specimens. **Diagnostic microbiology and infectious disease**, v. 93, n. 2, p. 107-111, 2019.

DAVIES, David G. et al. The involvement of cell-to-cell signals in the development of a bacterial biofilm. **Science**, v. 280, n. 5361, p. 295-298, 1998.

DAROUCHE, Rabih O. et al. A comparison of two antimicrobial-impregnated central venous catheters. **New England Journal of Medicine**, v. 340, n. 1, p. 1-8, 1999.

DE BONA, E. A. et al. Comparison of methods for evaluation of antimicrobial activity and determination of minimum inhibitory concentration (MIC) of aqueous and ethanol plant extracts. **Arq Inst Biol**, v. 81, n. 3, p. 218-225, 2014.

DEBNATH, Tonmoy et al. Presence of multidrug-resistant bacteria on mobile phones of healthcare workers accelerates the spread of nosocomial infection and Regarded as a Threat to Public Health in Bangladesh. **Journal of microscopy and ultrastructure**, v. 6, n. 3, p. 165, 2018.

DEL CASTILLO-JIMÉNEZ, M. Carmen et al. Infección ocular por *Pythium insidiosum*. **Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica**, v. 31, n. 2, p. 118-119, 2013.

DEL POZO, Jose Luis. Biofilm-related disease. **Expert review of anti-infective therapy**, v. 16, n. 1, p. 51-65, 2018.

DIDIER, FRAISSE et al. Caffeoyl derivatives: major antioxidant compounds of some wild herbs of the Asteraceae family. **Food and Nutrition Sciences**, v. 2011, 2011.

DINKOVA-KOSTOVA, Albena T. et al. Direct evidence that sulfhydryl groups of Keap1 are the sensors regulating induction of phase 2 enzymes that protect against carcinogens and oxidants. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 99, n. 18, p. 11908-11913, 2002.

DONLAN, Rodney M. Biofilm formation: a clinically relevant microbiological process. **Clinical Infectious Diseases**, v. 33, n. 8, p. 1387-1392, 2001.

DOMKE, Jan; RADMACHER, Manfred. Measuring the elastic properties of thin polymer films with the atomic force microscope. **Langmuir**, v. 14, n. 12, p. 3320-3325, 1998.

DOS SANTOS, Carlos EP et al. Epidemiological survey of equine pythiosis in the Brazilian Pantanal and nearby areas: results of 76 cases. **Journal of Equine Veterinary Science**, v. 34, n. 2, p. 270-274, 2014.

DROUIN, V. Sur une nouvelle mycose du cheval. **Recl. Med. Vet**, v. 3, p. 337-344, 1896.

EL-DIEN, Salah et al. Prevalence of *Aeromonas hydrophila* and *Yersinia Enterocolitica* in some sea foods sold in sharkia governorate markets and the effects of heat treatments on their viabilities. **Bulletin of Animal Health and Production in Africa**, v. 57, n. 3, 2009.

EMAD, A. et al. Relative microelastic mapping of living cells by atomic force microscopy. **Biophysical journal**, v. 74, n. 3, p. 1564-1578, 1998.

FARMER, Aaron R. et al. Combat-related *Pythium aphanidermatum* invasive wound infection: case report and discussion of utility of molecular diagnostics. **Journal of clinical microbiology**, v. 53, n. 6, p. 1968-1975, 2015.

FARIA, Sonia; JOAO, Ines; JORDAO, Luisa. General overview on nontuberculous mycobacteria, biofilms, and human infection. **Journal of pathogens**, v. 2015, 2015.

FAZLI, Mustafa et al. Regulation of biofilm formation in *Pseudomonas* and *Burkholderia* species. **Environmental microbiology**, v. 16, n. 7, p. 1961-1981, 2014.

FITZGERALD, Vanessa K. et al. A transfer-less, multi-well liquid culture feeding system for screening small molecules that affect the longevity of *Caenorhabditis elegans*. **Biotechniques**, v. 47, n. 6, p. ix-xv, 2009.

FLUIT, Ad C.; VISSER, Maarten R.; SCHMITZ, Franz-Josef. Molecular detection of antimicrobial resistance. **Clinical microbiology reviews**, v. 14, n. 4, p. 836-871, 2001.

GAASTRA, Wim et al. *Pythium insidiosum*: an overview. **Veterinary microbiology**, v. 146, n. 1-2, p. 1-16, 2010.

GASPAR, E. B. et al. Comparação de métodos para a avaliação *in vitro* de atividade antimicrobiana de extratos vegetais. **Embrapa Pecuária Sul-Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento (INFOTECA-E)**, 2017.

GAZE, William H. et al. Influence of humans on evolution and mobilization of environmental antibiotic resistome. **Emerging infectious diseases**, v. 19, n. 7, 2013.

GOMES, Laura Jane, and Marcos Affonso Ortiz GOMES. "Extrativismo e biodiversidade: o caso da fava-d'anta." *Ciência Hoje* 27.161 (2000): 66-69.

GRARE, Marion et al. In vitro activity of para-guanidinoethylcalix [4] arene against susceptible and antibiotic-resistant Gram-negative and Gram-positive bacteria. **Journal of antimicrobial chemotherapy**, v. 60, n. 3, p. 575-581, 2007.

GRIFFITH, David E.; AKSAMIT, Timothy R. Therapy of refractory nontuberculous mycobacterial lung disease. **Current opinion in infectious diseases**, v. 25, n. 2, p. 218-227, 2012.

GROOTERS, Amy M. Pythiosis, lagenidiosis, and zygomycosis in small animals. **Veterinary Clinics: Small Animal Practice**, v. 33, n. 4, p. 695-720, 2003.

GUAN, Wenqiang et al. Comparison of essential oils of clove buds extracted with supercritical carbon dioxide and other three traditional extraction methods. **Food Chemistry**, v. 101, n. 4, p. 1558-1564, 2007.

GUNDAVDA, Manit K. et al. Nontuberculous mycobacterial infection of the musculoskeletal system in immunocompetent hosts. **Indian journal of orthopaedics**, v. 51, n. 2, p. 205, 2017.

GUERRA, Miguel Pedro et al. Biodiversidade: aspectos biológicos, geográficos, legais e éticos. **Farmacognosia: da planta ao medicamento**, v. 6, p. 13-28, 2001.

HALLIWELL, Barry. Free radicals and other reactive species in disease. **Els**, p. 1-9, 2001.

HALSTROM, Samuel; PRICE, Patricia; THOMSON, Rachel. Environmental mycobacteria as a cause of human infection. **International journal of mycobacteriology**, v. 4, n. 2, p. 81-91, 2015.

HARWOOD, M. et al. A critical review of the data related to the safety of quercetin and lack of evidence of in vivo toxicity, including lack of genotoxic/carcinogenic properties. **Food and chemical toxicology**, v. 45, n. 11, p. 2179-2205, 2007.

- HAVSTEEN, Bent H. The biochemistry and medical significance of the flavonoids. **Pharmacology & therapeutics**, v. 96, n. 2-3, p. 67-202, 2002.
- HAYES, J. D.; FLANAGAN, J. U.; JOWSEY, I. R. **Annual Review of Pharmacology and Toxicology**, v. 45, p. 51, 2005.
- HENDRIX, James W. Sterol induction of reproduction and stimulation of growth of *Pythium* and *Phytophthora*. **Science**, v. 144, n. 3621, p. 1028-1029, 1964.
- HINTERDORFER, Peter et al. Detection and localization of individual antibody-antigen recognition events by atomic force microscopy. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 93, n. 8, p. 3477-3481, 1996.
- HOLZAPFEL, Boris Michael et al. How smart do biomaterials need to be? A translational science and clinical point of view. **Advanced drug delivery reviews**, v. 65, n. 4, p. 581-603, 2013.
- HUSSEIN, Ziyad et al. Detection of non-tuberculous mycobacteria in hospital water by culture and molecular methods. **International Journal of Medical Microbiology**, v. 299, n. 4, p. 281-290, 2009.
- IMWIDTHAYA, P. Human pythiosis in Thailand. **Postgraduate medical journal**, v. 70, n. 826, p. 558-560, 1994.
- IRIE, Yasuhiko et al. Self-produced exopolysaccharide is a signal that stimulates biofilm formation in *Pseudomonas aeruginosa*. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 109, n. 50, p. 20632-20636, 2012.
- JACKSON, Kara D. et al. Identification of *psl*, a locus encoding a potential exopolysaccharide that is essential for *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 biofilm formation. **Journal of bacteriology**, v. 186, n. 14, p. 4466-4475, 2004.
- JANDA, J. Michael; ABBOTT, Sharon L. The genus *Aeromonas*: taxonomy, pathogenicity, and infection. **Clinical microbiology reviews**, v. 23, n. 1, p. 35-73, 2010.
- JEONG, Suk Hyeon et al. Mycobacteriological characteristics and treatment outcomes in extrapulmonary *Mycobacterium abscessus* complex infections. **International Journal of Infectious Diseases**, v. 60, p. 49-56, 2017.
- JESUS, Francielli PK et al. In vitro synergism observed with azithromycin, clarithromycin, minocycline, or tigecycline in association with antifungal agents against *Pythium insidiosum*. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 58, n. 9, p. 5621-5625, 2014.
- JESUS, F. P. K. et al. In vitro activity of carvacrol and thymol combined with antifungals or antibacterials against *Pythium insidiosum*. **Journal de mycologie medicale**, v. 25, n. 2, p. e89-e93, 2015.
- JOHNSON, Margaret M.; ODELL, John A. Nontuberculous mycobacterial pulmonary infections. **Journal of thoracic disease**, v. 6, n. 3, p. 210, 2014.

KALETTA, Titus; HENGARTNER, Michael O. Finding function in novel targets: *C. elegans* as a model organism. **Nature reviews Drug discovery**, v. 5, n. 5, p. 387-399, 2006.

KAMPKÖTTER, A. et al. The Ginkgo biloba extract EGb761 reduces stress sensitivity, ROS accumulation and expression of catalase and glutathione S-transferase 4 in *Caenorhabditis elegans*. **Pharmacological Research**, v. 55, n. 2, p. 139-147, 2007.

KIM, Si Hyun; SHIN, Jeong Hwan. Identification of nontuberculous mycobacteria using multilocus sequence analysis of 16S rRNA, hsp65, and rpoB. **Journal of clinical laboratory analysis**, v. 32, n. 1, p. e22184, 2018.

KRAJAEJUN, Theerapong et al. Development and evaluation of an in-house enzyme-linked immunosorbent assay for early diagnosis and monitoring of human pythiosis. **Clin. Diagn. Lab. Immunol.**, v. 9, n. 2, p. 378-382, 2002.

KWON-CHUNG, K. J. Phylogenetic spectrum of fungi that are pathogenic to humans. **Clinical infectious diseases**, v. 19, n. Supplement_1, p. S1-S7, 1994.

LAHIRI, Dibyajit et al. Elucidating the effect of anti-biofilm activity of bioactive compounds extracted from plants. **Journal of biosciences**, v. 44, n. 2, p. 52, 2019.

LEE, Ching-Chi et al. Necrotizing fasciitis in patients with liver cirrhosis: predominance of monomicrobial Gram-negative bacillary infections. **Diagnostic microbiology and infectious disease**, v. 62, n. 2, p. 219-225, 2008.

LEE, Wonyoung; LEE, Dong Gun. An antifungal mechanism of curcumin lies in membrane-targeted action within *Candida albicans*. **IUBMB life**, v. 66, n. 11, p. 780-785, 2014.

LEE, Heejeong; LEE, Dong Gun. Mode of action of bioactive phytochemicals, plant secondary metabolites, possessing antimicrobial properties. **The battle against microbial pathogens: basic science, technological advances and educational programs. FORMATEX, Spain**, p. 185-192, 2015.

LEAL, Adriana B. Monteiro et al. Pitiose equina no Pantanal brasileiro: aspectos clínico-patológicos de casos típicos e atípicos. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 21, n. 4, p. 151-156, 2001.

LORENZI, Harri; MATOS, Francisco J. **Plantas medicinais no Brasil: nativas e exóticas**. 2002.

LORETO, Erico S. et al. Efficacy of azithromycin and miltefosine in experimental systemic pythiosis in immunosuppressed mice. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 63, n. 1, p. e01385-18, 2019.

MA, Luyan et al. Analysis of *Pseudomonas aeruginosa* conditional psl variants reveals roles for the psl polysaccharide in adhesion and maintaining biofilm structure postattachment. **Journal of bacteriology**, v. 188, n. 23, p. 8213-8221, 2006.

MADIGAN, Michael T. et al. **Microbiologia de Brock-14ª Edição**. Artmed Editora, 2016.

- MAJI, Amal K.; BANERJI, Pratim. Chelidonium majus L.(Greater celandine)—a review on its phytochemical and therapeutic perspectives. **International Journal of Herbal Medicine**, v. 3, n. 1, p. 10-27, 2015.
- MAKI, D. G.; ALVARADO, C. J.; RINGER, M. Prospective randomised trial of povidone-iodine, alcohol, and chlorhexidine for prevention of infection associated with central venous and arterial catheters. **The Lancet**, v. 338, n. 8763, p. 339-343, 1991.
- MARCINKIEWICZ, Janusz; STRUS, Magdalena; PASICH, Ewa. Antibiotic resistance: a “dark side” of biofilm-associated chronic infections. **Pol Arch Med Wewn**, v. 123, n. 6, p. 309-13, 2013.
- MARTINEZ-GUTIERREZ, Fidel et al. Anti-biofilm activity of silver nanoparticles against different microorganisms. **Biofouling**, v. 29, n. 6, p. 651-660, 2013.
- MARQUES, Silvio Alencar et al. *Pythium insidiosum*: relato do primeiro caso de infecção humana no Brasil. **Anais brasileiros de dermatologia**, v. 81, n. 5, p. 483-485, 2006.
- MENDOZA, Leonel; HERNANDEZ, Francisco; AJELLO, Libero. Life cycle of the human and animal oomycete pathogen *Pythium insidiosum*. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 31, n. 11, p. 2967-2973, 1993.
- MENDOZA, Leonel; AJELLO, L.; MCGINNIS, M. Infections caused by the oomycetous pathogen *Pythium insidiosum*. Infecciones causadas por el patógeno oomiceto *Pythium insidiosum*. **Journal de Mycologie Medicale**, v. 6, n. 4, p. 151-64, 1996.
- MENDOZA, Leonel et al. Serodiagnosis of human and animal pythiosis using an enzyme-linked immunosorbent assay. **Clin. Diagn. Lab. Immunol.**, v. 4, n. 6, p. 715-718, 1997.
- MENDOZA, Leonel; NEWTON, Joseph C. Immunology and immunotherapy of the infections caused by *Pythium insidiosum*. **Medical Mycology**, v. 43, n. 6, p. 477-486, 2005.
- MERTANIASIH, Ni Made et al. Nontuberculous mycobacterial species and *Mycobacterium tuberculosis* complex coinfection in patients with pulmonary tuberculosis in Dr. Soetomo Hospital, Surabaya, Indonesia. **International journal of mycobacteriology**, v. 6, n. 1, p. 9-13, 2017.
- Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria that Grow Aerobically, 2012.
- MILLER, R. I. Investigations into the biology of three ‘phycomycotic’ agents pathogenic for horses in Australia. **Mycopathologia**, v. 81, n. 1, p. 23-28, 1983.
- MILLER, R. I.; CAMPBELL, R. S. Haematology of horses with phycomycosis. **Australian veterinary journal**, v. 60, n. 1, p. 28-29, 1983.
- MORKUNAS, Bernardas et al. Discovery of an inhibitor of the production of the *Pseudomonas aeruginosa* virulence factor pyocyanin in wild-type cells. **Beilstein journal of organic chemistry**, v. 12, n. 1, p. 1428-1433, 2016.

- MIQUEL, Sylvie et al. Anti-biofilm activity as a health issue. **Frontiers in microbiology**, v. 7, p. 592, 2016.
- MOUREAU, Nancy L.; FLYNN, Julie. Disinfection of needleless connector hubs: clinical evidence systematic review. **Nursing research and practice**, v. 2015, 2015.
- MURUGAN, K.; SELVANAYAKI, K.; AL-SOHAIBANI, Saleh. Antibiofilm activity of *Andrographis paniculata* against cystic fibrosis clinical isolate *Pseudomonas aeruginosa*. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 27, n. 7, p. 1661-1668, 2011.
- NAZZARO, Filomena et al. Effect of essential oils on pathogenic bacteria. **Pharmaceuticals**, v. 6, n. 12, p. 1451-1474, 2013.
- NEIHARDT, F. Bacterial genetics. **Medical Microbiology: An Introduction to Infectious Diseases Fourth Edition**. McGraw-Hill, London, p. 53-75, 2004.
- NORBEDO, C.; FERRARO, G.; COUSSIO, J. D. A new flavanone from *Achyrocline flaccida*. **Journal of Natural Products**, v. 45, n. 5, p. 635-636, 1982.
- NORBEDO, C.; FERRARO, G.; COUSSIO, J. D. Flavonoids from *Achyrocline flaccida*. **Phytochemistry**, v. 23, n. 11, p. 2698-2700, 1984.
- O'NEILL J, chairman. The Review on Antimicrobial Resistance, December 2014. <http://amr-review.org>
- OTTAVIANI, Donatella et al. Putative virulence properties of *Aeromonas* strains isolated from food, environmental and clinical sources in Italy: a comparative study. **International journal of food microbiology**, v. 144, n. 3, p. 538-545, 2011.
- PANG, Maoda et al. Novel insights into the pathogenicity of epidemic *Aeromonas hydrophila* ST251 clones from comparative genomics. **Scientific reports**, v. 5, p. 9833, 2015.
- PARKER, Jennifer L.; SHAW, Jonathan G. *Aeromonas* spp. clinical microbiology and disease. **Journal of Infection**, v. 62, n. 2, p. 109-118, 2011.
- PEATMAN, Eric et al. Mechanisms of pathogen virulence and host susceptibility in virulent *Aeromonas hydrophila* infections of channel catfish (*Ictalurus punctatus*). **Aquaculture**, v. 482, p. 1-8, 2018.
- PÉREZ, Rosa Cristina et al. Epizootic cutaneous pythiosis in beef calves. **Veterinary microbiology**, v. 109, n. 1-2, p. 121-128, 2005.
- PLUMB, John A. **Health maintenance of cultured fishes: principal microbial diseases**. CRC Press, 2018.
- PRAKASH, O. et al. Polyphasic approach of bacterial classification—an overview of recent advances. **Indian journal of microbiology**, v. 47, n. 2, p. 98-108, 2007.

- PROENÇA DA CUNHA, A.; CAVALEIRO, C.; SALGUEIRO, L. Fármacos Aromáticos (Plantas aromáticas e Óleos Essenciais)'. **Fundação Calouste Gulbenkian (ed.), Farmacologia e Fitoquímica**, 2010.
- RAKICH, Pauline M.; GROOTERS, Amy M.; TANG, Kai-Ning. Gastrointestinal pythiosis in two cats. **Journal of veterinary diagnostic investigation**, v. 17, n. 3, p. 262-269, 2005.
- RAMAMURTHY, Thandavarayan et al. Current perspectives on viable but non-culturable (VBNC) pathogenic bacteria. **Frontiers in public health**, v. 2, p. 103, 2014.
- RAUT, Jayant Shankar; KARUPPAYIL, Sankunny Mohan. A status review on the medicinal properties of essential oils. **Industrial Crops and Products**, v. 62, p. 250-264, 2014.
- RENNER, Lars D.; WEIBEL, Douglas B. Physicochemical regulation of biofilm formation. **MRS bulletin**, v. 36, n. 5, p. 347-355, 2011.
- RETTA, Daiana et al. Marcela, a promising medicinal and aromatic plant from Latin America: a review. **Industrial Crops and Products**, v. 38, p. 27-38, 2012.
- RIETJENS, Ivonne MCM et al. Flavonoids and alkenylbenzenes: mechanisms of mutagenic action and carcinogenic risk. **Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis**, v. 574, n. 1-2, p. 124-138, 2005.
- RYERONYMUS, J. (1982) Boletim Academia Nacional de Ciencia de Cordoba 4, 199.
- ROTSCH, Christian; RADMACHER, Manfred. Mapping local electrostatic forces with the atomic force microscope. **Langmuir**, v. 13, n. 10, p. 2825-2832, 1997.
- SABINI, Maria Carola et al. Evaluation of the cytotoxicity, genotoxicity and apoptotic induction of an aqueous extract of *Achyrocline satureioides* (Lam.) DC. **Food and chemical toxicology**, v. 60, p. 463-470, 2013.
- SAMPAIO, Jorge Luiz Mello. **Caracterização de betalactamases de espectro ampliado e KPC em *Enterobacter cloacae* e *Enterobacter aerogenes* isoladas de casos de infecções relacionadas aos cuidados com a saúde em pacientes atendidos em hospitais da cidade de São Paulo**. 2011. Tese de Doutorado. Universidade de São Paulo.
- SANTOS, Joyce Silva dos; VIEIRA, Ana Beatriz Duarte; KAMADA, Ivone. A Rosa Mosqueta no tratamento de feridas abertas: uma revisão. **Revista Brasileira de Enfermagem**, v. 62, n. 3, p. 457-462, 2009.
- SANTURIO, Janio M. et al. Teste de ELISA indireto para o diagnóstico sorológico de pitiose. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 26, n. 1, p. 47-50, 2006.
- SANTURIO, J. M. **Pitiose: uma abordagem micológica e terapêutica**. Editora da UFGRS, 2008.
- SAK, Katrin. Chemotherapy and dietary phytochemical agents. **Chemotherapy research and practice**, v. 2012, 2012.

- SEFIDKON, Fatemeh et al. The effect of distillation methods and stage of plant growth on the essential oil content and composition of *Satureja rechingeri* Jamzad. **Food chemistry**, v. 100, n. 3, p. 1054-1058, 2007.
- SCALBERT, Augustin. Antimicrobial properties of tannins. **Phytochemistry**, v. 30, n. 12, p. 3875-3883, 1991.
- SIES H., JONES D. Oxidative stress. In: Fink G., editor. 2^a ed. Vol. 3. Elsevier; Amsterdam: 2007. pp. 45–48. (Enciclopédia do Stress).
- SOOD, S.; Yadav, A.; Shrivastava, R. *Mycobacterium aurum* is unable to survive *Mycobacterium tuberculosis* latency associated stress conditions: Implications as non-suitable model organism. *Indian J. Microbiol.* **2016**, 56, 198–204.
- SLOBODNÍKOVÁ, Livia et al. Antibiofilm activity of plant polyphenols. **Molecules**, v. 21, n. 12, p. 1717, 2016.
- SMITH, F. The pathology of bursattee. **The Veterinary Journal and Annals of Comparative Pathology**, v. 19, n. 7, p. 16-17, 1884.
- SPRANDO, Robert L. et al. A method to rank order water soluble compounds according to their toxicity using *Caenorhabditis elegans*, a Complex Object Parametric Analyzer and Sorter, and axenic liquid media. **Food and chemical toxicology**, v. 47, n. 4, p. 722-728, 2009.
- SHAW, Ling Fu et al. Factors influencing microbial colonies in the air of operating rooms. **BMC infectious diseases**, v. 18, n. 1, p. 4, 2018.
- SHAO, Yan et al. The epidemiology and geographic distribution of nontuberculous mycobacteria clinical isolates from sputum samples in the eastern region of China. **PLoS neglected tropical diseases**, v. 9, n. 3, 2015.
- TAVARES, Alana Borges; CERESER, Natacha Deboni; TIMM, Cláudio Dias. Ocorrência de *Aeromonas* spp. em alimentos de origem animal e sua importância em saúde pública. **Arq. Inst. Biol., São Paulo**, v. 82, p. 1-8, 2015.
- TEIXEIRA, Bárbara et al. Chemical composition and antibacterial and antioxidant properties of commercial essential oils. **Industrial Crops and Products**, v. 43, p. 587-595, 2013.
- TODAR, Kenneth. Bacterial resistance to antibiotics (page 3). **Todar's online textbook of bacteriology**, p. 4, 2011.
- TOLERA, Moti et al. Bacterial nosocomial infections and antimicrobial susceptibility pattern among patients admitted at Hiwot Fana Specialized University Hospital, Eastern Ethiopia. **Advances in medicine**, v. 2018, 2018.
- TOLKER-NIELSEN, Tim. Biofilm development. **Microbial Biofilms**, p. 51-66, 2015.
- TOMICH, Thierry Ribeiro et al. Impacto econômico decorrente do controle da pitiose equina empregando-se o imunoterápico Pitum-Vac. In: **Embrapa Pantanal-Artigo em anais de**

congresso (ALICE). SIMPÓSIO SOBRE RECURSOS NATURAIS E SOCIOECONÔMICOS DO PANTANAL, 5., 2010, Corumbá, MS. Anais... Corumbá: Embrapa Pantanal: UFMS; Campinas: ICS do Brasil, 2010. 1 CD-ROM SIMPAN 2010., 2010.

TOMINAGA, Kazunari et al. In vivo action of novel alkyl methyl quinolone alkaloids against *Helicobacter pylori*. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 50, n. 4, p. 547-552, 2002.

TRENTIN, Danielle Silva et al. Medicinal plants from Brazilian Caatinga: Antibiofilm and antibacterial activities against *Pseudomonas aeruginosa*. **Revista Caatinga**, v. 27, n. 3, p. 264-271, 2014.

TRISCOTT, Joseph A.; WEEDON, David; CABANA, Esmeraldo. Human subcutaneous pythiosis. **Journal of cutaneous pathology**, v. 20, n. 3, p. 267-271, 1993.

TROLEZI, R. J. et al. *Tryphnodendron adstringens* and purified tannin on *Pythium insidiosum*: *in vitro* and *in vivo* studies, *Ann. Clin. Microbiol. Antimicrob.* 16 (2017) 7.

UMRAO, Jyoti et al. Prevalence and species spectrum of both pulmonary and extrapulmonary nontuberculous mycobacteria isolates at a tertiary care center. **International journal of mycobacteriology**, v. 5, n. 3, p. 288-293, 2016.

UPADHYAY, Abhinav et al. Combating pathogenic microorganisms using plant-derived antimicrobials: a minireview of the mechanistic basis. **BioMed research international**, v. 2014, 2014.

VALENTE, J. A. Fonseca, L. Denardi, V. Dal Ben, F. Filho, C. Zambrano, et al., In vitro activity of antifungals in combination with essential oils against the oomycete *Pythium insidiosum*, *J. Appl. Microbiol.* 121 (2016) 998–1003.

VAN INGEN, Jakko et al. Are phylogenetic position, virulence, drug susceptibility and in vivo response to treatment in mycobacteria interrelated? **Infection, Genetics and Evolution**, v. 12, n. 4, p. 832-837, 2012.

VIANA-NIERO, Cristina et al. Molecular characterization of *Mycobacterium massiliense* and *Mycobacterium bolletii* in isolates collected from outbreaks of infections after laparoscopic surgeries and cosmetic procedures. **Journal of clinical microbiology**, v. 46, n. 3, p. 850-855, 2008.

VON REYN, C. F. et al. Sources of disseminated *Mycobacterium avium* infection in AIDS. **Journal of Infection**, v. 44, n. 3, p. 166-170, 2002.

XU, De-Hai, et al. "Parasitism by protozoan *Ichthyophthirius multifiliis* enhanced invasion of *Aeromonas hydrophila* in tissues of channel catfish." *Veterinary parasitology* 184.2-4 (2012): 101-107.

ZANETTE, R. P. et al., *In vitro* susceptibility of *Pythium insidiosum* to garlic extract, *Afr. J. Microbiol. Res.* 5 (2011) 5316–5318.

WANG, Xin; PRESTON, James F.; ROMEO, Tony. The pgaABCD locus of *Escherichia coli* promotes the synthesis of a polysaccharide adhesin required for biofilm formation. **Journal of bacteriology**, v. 186, n. 9, p. 2724-2734, 2004.

WANG, Guanyu et al. Quercetin potentiates doxorubicin mediated antitumor effects against liver cancer through p53/Bcl-xl. **PloS one**, v. 7, n. 12, 2012.

WEISS, C. H.; GLASSROTH, J. Pulmonary disease caused by nontuberculous mycobacteria. *Expert Rev Respir Med* 6: 597–613. 2012.

WENDT, Stephen L. et al. Epidemiology of infection by nontuberculous mycobacteria: III. Isolation of potentially pathogenic mycobacteria from aerosols. **American Review of Respiratory Disease**, v. 122, n. 2, p. 259-263, 1980.

WOOLHOUSE, Mark; FARRAR, Jeremy. Policy: an intergovernmental panel on antimicrobial resistance. **Nature News**, v. 509, n. 7502, p. 555, 2014.

WOODFORD, Niel; ELLINGTON, Matthew J. The emergence of antibiotic resistance by mutation. **Clinical Microbiology and Infection**, v. 13, n. 1, p. 5-18, 2007.

WORLD HEALTH ORGANIZATION et al. **Antimicrobial resistance: global report on surveillance**. World Health Organization, 2014.

WHITE, S. D. et al. Cutaneous pythiosis in a California nontravelled horse. **Vet. Dermatol**, v. 19, n. 6, p. 391-394, 2008.

WRIGHT, Gerard D. The antibiotic resistome. **Expert opinion on drug discovery**, v. 5, n. 8, p. 779-788, 2010.

ANEXOS

ANEXO A - Sistema Nacional de Gestão de Patrimônio Genético e do Conhecimento Tradicional Associado



Ministério do Meio Ambiente
CONSELHO DE GESTÃO DO PATRIMÔNIO GENÉTICO

SISTEMA NACIONAL DE GESTÃO DO PATRIMÔNIO GENÉTICO E DO CONHECIMENTO TRADICIONAL ASSOCIADO

Certidão

Cadastro nº A76E00E

Declaramos, nos termos do art. 41 do Decreto nº 8.772/2016, que o cadastro de acesso ao patrimônio genético ou conhecimento tradicional associado, abaixo identificado e resumido, no Sistema Nacional de Gestão do Patrimônio Genético e do Conhecimento Tradicional Associado foi submetido ao procedimento administrativo de verificação e não foi objeto de requerimentos admitidos de verificação de indícios de irregularidades ou, caso tenha sido, o requerimento de verificação não foi acatado pelo CGen.

Número do cadastro: A76E00E
 Usuário: Roberto Christ Vianna Santos
 CPF/CNPJ: 837.018.830-88
 Objeto do Acesso: Patrimônio Genético/CTA
 Finalidade do Acesso: Pesquisa

Espécie

Achyrocline floecida
 Achyrocline floecida

Fonte do CTA

CTA de origem não identificável

Título da Atividade: Atividade Antimicrobiana do óleo essencial, extrato hidroalcoólico e bruto da Achyrocline floecida

Equipe

Roberto Christ Vianna Santos	UFSM
Vanessa Schopf Machado	UFSM
Vitor Cortelline Roos	UFSM
Marcos Vinícius Miccel	UFSM
Camila Marina Verdi	UFSM
Fabiana de Cássia Romanha Sturmer	UFSM
Michele Rorato Sagrillo	UFN

Data do Cadastro: 17/10/2018 10:52:38

Situação do Cadastro: Concluído

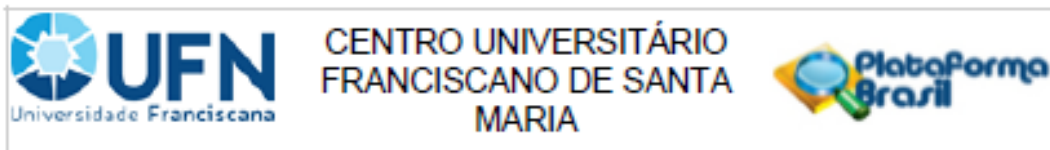


Conselho de Gestão do Patrimônio Genético
 Situação cadastral conforme consulta ao SisGen em 17:04 de 16/06/2018.



SISTEMA NACIONAL DE GESTÃO
 DO PATRIMÔNIO GENÉTICO
 E DO CONHECIMENTO TRADICIONAL
 ASSOCIADO - SISGEN

ANEXO B - Carta de aprovação pelo Comitê de Ética da Universidade Franciscana para uso de células polimorfonucleares de sangue periférico



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DA EMENDA

Título da Pesquisa: Avaliação da cito-genotoxicidade de compostos na sua forma livre e nanoestruturada em células mononucleadas de sangue periférico

Pesquisador: Michele Rorato Sagrillo

Área Temática: Genética Humana:

(Trata-se de pesquisa envolvendo Genética Humana que não necessita de análise ética por parte da CONEP.);

Versão: 3

CAAE: 31211214.4.0000.5306

Instituição Proponente: Centro Universitário Franciscano - UNIFRA

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 2.591.719

Apresentação do Projeto:

As Células Mononucleadas de Sangue Periférico (CMSP) têm sido aplicadas por décadas como biomarcadoras de efeitos cito e genotóxicos, entre outros. Por serem abundantes na circulação sanguínea, são expostas a qualquer agente mutagênico e são capazes de refletir danos recentes. As CMSP semeadas em cultura tornaram-se o modelo in vitro bastante promissor para diversos estudos, o que ressalta a utilidade desta linhagem

celular em estudos de cito-genotoxicidade. Neste contexto, o objetivo desta pesquisa é avaliar os potenciais efeitos cito-genotóxicos dos sistemas Nanoestruturados em cultura de células mononucleadas de sangue periférico, através da viabilidade celular, peroxidação lipídica, presença de instabilidades cromossômicas, Índice mitótico e alterações metanucleares.

A metodologia proposta para a realização das avaliações de cito-genotoxicidade será viabilidade celular, pela técnica do MTT, peroxidação lipídica (TBARS), catalase, presença de instabilidades cromossômicas, Índice mitótico e alterações metanucleares, hemólise e indicadores de estresse oxidativo.

Objetivo da Pesquisa:

Objetivo Primário:

Neste contexto, o objetivo deste estudo é avaliar os potenciais efeitos cito-genotóxicos de

Endereço: R. dos Andrada, 1614 - Prédio da Reitoria - Campus I - 6ª andar
Bairro: Centro **CEP:** 97.010-032
UF: RS **Município:** SANTA MARIA
Telefone: (55)3220-1200 **Fax:** (55)3222-6484 **E-mail:** cep@unifra.br

ANEXO C - Comprovante de envio manuscrito I para a revista *Natural Product Research*.



In vitro anti-*Pythium insidiosum* activity of *Achyrocline flaccida* aqueous extract

Journal:	<i>Natural Product Research</i>
Manuscript ID	GNPL-2021-2205
Manuscript Type:	Research Article
Date Submitted by the Author:	28-Sep-2021
Complete List of Authors:	Machado, Vanessa; Universidade Federal de Santa Maria, ; Baccarin, Lara; UFSM Stibbe, Paula; UFSM Denardi, Laura ; Universidade Federal de Santa Maria Sturmer, Fabiana; UFSM Verdi, Camila; Federal University of Santa Maria Emanuelli, Tatiana; UFSM Somacal, Sabrina; Federal University of Santa Maria Brayer Pereira, Daniela Isabel; UFPEL Botton, Sonia; UFSM Santurio, J. M.; Universidade Federal de Santa Maria, dos Santos, Roberto; UFSM, Laboratório de Pesquisa em Microbiologia Oral
Keywords:	oomycete, pythiosis, natural compound, susceptibility, <i>Achyrocline flaccida</i>

ANEXO D - Autorização da revista *Natural Product Research* (Short Communication I)

ENC: gnpl20:Achyrocline flaccida essential oil from Brazil: phytochemical composition, genotoxicity, protective effects on *Caenorhabditis elegans*, and antimycobacterial activity

Dear Vanessa Schopf Machado,

Vanessa Schopf Machado, Camila Marina Verdi, Sabrina Somacal, Grazielle Guidolin Rossi, Marina Lopes Machado, Bruna Klein, Vitor Corteline Roos, Carolina Gonzalez Urquhart, Ionara Irion Dalcol, Michele Rorato Sagrillo, Alencar Kolinsk Machado, Marli Matiko Campos, Roger Wagner & Roberto Christ Vianna Santos (2020): *Achyroclineflaccida* essential oil from Brazil: phytochemical composition, genotoxicity, protective effects on *Caenorhabditiselegans*, and antimycobacterial activity, *Natural Product Research*, DOI: 10.1080/14786419.2020.1802269

Thank you for your correspondence requesting permission to reproduce the above content from our Journal in your online thesis / dissertation and to be posted in the university's repository – Universidade Federal de Santa Maria.

We will be pleased to grant permission to reproduce your '**Accepted Manuscript**' on the sole condition that you acknowledge the original source of publication.

This is an '**Accepted Manuscript**' of an article published by Taylor & Francis Group in **Natural Product Research** on 03 Aug 2020 available online: <https://doi.org/10.1080/14786419.2020.1802269>

Please note: This **does not allow** the use of the **Version of Record (VoR)** to be posted online, however you may include the VoR as an Appendix to the printed version of your thesis / dissertation. (The VoR is the final, definitive, citable version of your paper, which has been copyedited, typeset, had metadata applied, and has been allocated a DOI; the PDF version on [Taylor & Francis Online](#))

Using a DOI to link to the VoR on Taylor & Francis Online means that downloads, Altmetric data, and citations can be tracked and collated – data you can use to assess the impact of your work.

This permission does not cover any third party copyrighted work which may appear in the material requested.

Sharing your work - <https://authorservices.taylorandfrancis.com/sharing-your-work/>

://outlook.live.com/mail/0/inbox/id/AQMkADAwATMwMAItYTBiNi1INjUzLTAwAi0wMAoARgAAA%2BsatbOhPFZEKZI4xdq82%2FIHADE3SUaXss... 1/3

0/2021 16:13

Email – Vanessa Machado – Outlook

Thank you for your interest in our journals.

Yours Sincerely

ANEXO E - Autorização da revista *Natural Product Research* (Short Communication II)

RE: gnpl20:Antimycobacterial activity of *Achyrocline flaccida* (Asteraceae) aqueous extract from Southern Brazil

Academic UK Non Rightslink <permissionrequest@tandf.co.uk>

Ter, 05/10/2021 12:18

Para: Vanessa Schopf Machado <vanessasmachado@live.com>

05 October 2021

Dear Vanessa Schopf Machado,

Vanessa Schopf Machado, Camila Marina Verdi, Grazielle Guidolin Rossi, Larissa Ilha de Souza, Cristiane Antunes Teixeira, Marina Lopes Machado, Tássia Limana da Silveira, Michele Rorato Sagrillo, Alencar Kolinski Machado, Rafaela Castro Dornelles, Marli Matiko Campos, Eliseu Rodrigues, Tatiana Emanuelli, Sabrina Somacal & Roberto Christ Vianna Santos (2021) Antimycobacterial activity of *Achyrocline flaccida* (Asteraceae) aqueous extract from Southern Brazil, *Natural Product Research*, DOI: 10.1080/14786419.2021.1931183

Thank you for your correspondence requesting permission to reproduce the above content from our Journal in your thesis entitled "CARACTERIZAÇÃO, TOXICIDADE, ATIVIDADE ANTIOXIDANTE, ANTIMICROBIANA E ANTIBIOFILME DO ÓLEO ESSENCIAL E EXTRATO DE *Achyrocline flaccida*" to be posted in Universidade Federal de Santa Maria's repository.

We will be pleased to grant permission to reproduce your **article as it was originally submitted** to the journal on the condition that you make the following acknowledgement:

"This is an '**Original Manuscript**' of an article published by Taylor & Francis Group in **Natural Product Research** on 27 May 2021, available online:
<https://www.tandfonline.com/doi/full/10.1080/14786419.2021.1931183>

You will also need to obtain permission from any co-author's of this article.

Please note we are unable to grant you permission to include the **final accepted version** within the **12 month embargo period**.

Please note: This **does not allow** the use of the **Version of Record (VoR)** to be posted online, however you may include the VoR as an Appendix to the printed version of your thesis / dissertation. (The VoR is the final, definitive, citable version of your paper, which has been copyedited, typeset, had metadata applied, and has been allocated a DOI; the PDF version on [Taylor & Francis Online](#))

Using a DOI to link to the VoR on Taylor & Francis Online means that downloads, Altmetric data, and citations can be tracked and collated – data you can use to assess the impact of your work.

This permission does not cover any third party copyrighted work which may appear in the material requested.