



UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS
DEPARTAMENTO DE ENGENHARIA DE PESCA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA DE RECURSOS
NATURAIS

MAYARA FREIRE DE ALENCAR ALVES

POTENCIAL ANTIMICROBIANO E ANTIBIOFILME DO EXTRATO
HIDROALCOÓLICO DA CASCA DO CAULE DE *Croton blanchetianus*

FORTALEZA

2020

MAYARA FREIRE DE ALENCAR ALVES

POTENCIAL ANTIMICROBIANO E ANTIBIOFILME DO EXTRATO
HIDROALCOÓLICO DA CASCA DO CAULE DE *Croton blanchetianus*

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia de Recursos Naturais do Departamento de Engenharia de Pesca da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial para obtenção do título de Doutor em Biotecnologia de Recursos Naturais.

Orientador: Prof. Dr. Edson Holanda
Teixeira.

Coorientador: Prof. Dr. Mayron Alves
Vasconcelos

FORTALEZA

2020

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
Universidade Federal do Ceará
Sistema de Bibliotecas

Gerada automaticamente pelo módulo Catalog, mediante os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

- A48p Alves, Mayara Freire de Alencar.
Potencial antimicrobiano e antibiofilme do extrato hidroalcoólico da casca do caule de *Croton blanchetianus* / Mayara Freire de Alencar Alves. – 2020.
71 f. : il. color.
- Tese (doutorado) – Universidade Federal do Ceará, Centro de Ciências Agrárias, Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia de Recursos Naturais, Fortaleza, 2020.
Orientação: Prof. Dr. Edson Holanda Teixeira.
Coorientação: Prof. Dr. Mayron Alves Vasconcelos.

1. Biofilmes. 2. Biofilmes mistos. 3. Diterpenos. 4. Ácido hardwickiico. I. Título.

CDD 660.6

MAYARA FREIRE DE ALENCAR ALVES

POTENCIAL ANTIMICROBIANO E ANTIBIOFILME DO EXTRATO
HIDROALCOÓLICO DA CASCA DO CAULE DE *Croton blanchetianus*

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia de Recursos Naturais do Departamento de Engenharia de Pesca da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial para obtenção do título de Doutor em Biotecnologia de Recursos Naturais.

Data da aprovação: 31/01/2020.

BANCA EXAMINADORA:

Prof. Dr. Edson Holanda Teixeira (Orientador)
Universidade Federal do Ceará

Prof. Dr. Mayron Alves de Vasconcelos (Coorientador)
Universidade Federal do Ceará

Prof. Dr. André Luís Coelho da Silva
Universidade Federal do Ceará

Prof. Dr. José Ajax Nogueira Queiroz
Universidade Federal do Ceará

Prof. Dr. Francisco Serra Oliveira Alexandre
Universidade Federal do Ceará

Prof. Dr. Hécio Silva dos Santos
Universidade Estadual Vale do Acaraú

A Deus, minha proteção, minha força,
meu amparo.

À minha família, que se dedica,
participa e investe na minha
educação.

Dedico.

AGRADECIMENTOS

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Código de Financiamento 001.

À FUNCAP pelo auxílio financeiro.

À diversidade da vida por todas as possibilidades de investigação: a busca por respostas e a formulação de novas perguntas.

Aos meus pais, Gesser e Elioene por todo carinho e apoio durante os meus anos de educação e por me incentivarem a seguir a carreira acadêmica.

Ao meu orientador, Prof. Dr. Edson Holanda Teixeira, pela confiança conferida a mim nesse período. Aos seus conselhos profissionais, as discussões, e principalmente a paciência foram todos passos para construir o meu caminho acadêmico.

Aos amigos de pós-graduação, Mayron, Alison, Aryane, Alexandre, Anna e os alunos de iniciação científica, Gabi, Lívia, Bia, Raylanne pelo apoio técnico e científico principalmente no último e difícil ano.

Aos professores do Programa de Pós-graduação em Biotecnologia de Recursos Naturais.

Agradeço.

“Deem graças ao Senhor porque ele é bom; o seu amor dura para sempre.”
(Salmo 118:1)

RESUMO

As infecções associadas aos cuidados de saúde (IRAS) apresentam impacto sobre letalidade hospitalar, duração da internação e custos adicionais onerando o sistema de saúde. Biofilmes são responsáveis pela patogênese das IRAS principalmente por terem a facilidade de se aderirem a uma superfície produzindo matriz extracelular que facilita a comunicação microrganismo-microrganismo aumentando a sua resistência a antimicrobianos. Sabendo que extratos de plantas da Caatinga ricos em diterpenos são popularmente usados como antimicrobianos este estudo investigou a atividade antimicrobiana e antibiofilme do extrato isolado da casca do *Croton blanchetianus*. No estudo foi analisado o CIM, CMB, atividade metabólica, a cinética de morte das estipes de *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Candida albicans* isoladas e combinadas entre si. Foram analisadas também as alterações morfológicas através da microscopia eletrônica de varredura e viabilidade celular bacteriana por microscopia confocal a laser combinada com LIVE/DEAD. Para comprovar que o ácido hardwickiico não possui toxicidade frente a células eucariontes, foram testadas as células de queratinócitos e fibroblastos. Nossos resultados sugerem que o extrato rico em diterpeno clerodano, o ácido hardwickiico interfere no crescimento planctônico e de biofilmes mono e multiespécie por interação com a membrana microbiana e com estruturas presentes na matriz extracelular. Tal fato reforça a idéia de que diterpenos são promissores antimicrobianos e que o resultado disso é de suma relevância para a prospecção de uma nova molécula antimicrobiana.

Palavras-chave: ácido hardwickiico; biofilme; biofilme misto; diterpeno.

ABSTRACT

Health care-associated infections (HAIs) have an impact on hospital mortality, length of hospital stay and additional costs that burden the health system. Biofilms are responsible for the pathogenesis of HAIs mainly because they have the facility to adhere to a surface producing an extracellular matrix that facilitates microorganism-microorganism communication, increasing its resistance to antimicrobials. Knowing that extracts from Caatinga plants rich in diterpenes are popularly used as antimicrobials, this study investigated the antimicrobial and antibiofilm activity of the extract isolated from the bark of *Croton blanchetianus*. In the study, CIM, CMB, metabolic activity, death kinetics of *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa* and *Candida albicans* strains were isolated and combined. Morphological changes were also analyzed using scanning electron microscopy and bacterial cell viability by laser confocal microscopy combined with LIVE / DEAD. To prove that hardwickic acid has no toxicity to eukaryotic cells, keratinocyte and fibroblast cells were tested. Our results suggest that the extract rich in clerodane diterpene, hardwickic acid interferes with planktonic and mono and multispecies biofilm growth by interaction with the microbial membrane and with structures present in the extracellular matrix. This fact reinforces the idea that diterpenes are promising antimicrobials and that the result is of paramount importance for the prospect of a new antimicrobial molecule.

Keywords: hardwickic acid; biofilm; multispecies biofilm; diterpene.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Estrutura do biofilme bacteriano e suas fases de formação.....	16
Figura 2 - Representação didática das interações de quorum sensing e quorum quenching no biofilme maduro.	17
Figura 3 - Etapas da formação de um biofilme multiespecie.	18
Figura 4 - Representação didática das interações entre fungos e bactérias.	20
Figura 5 - Aspectos gerais das folhas, inflorescências e frutos do <i>Croton blanchetianus</i>	26
Figura 6 - Distribuição geográfica do <i>Croton blanchetianus</i>	27
Figura 7 - Constituintes metabólicos secundários do gênero <i>Croton</i>	28
Figura 8 - Estrutura do ácido hardwickiico.....	28
Figura 9 - Microscopia eletrônica de varredura de biofilme monoespécie de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC9027.	53
Figura 10 - Microscopia eletrônica de varredura de biofilme misto de <i>Candida albicans</i> ATCC90028 e <i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC9027.	54
Figura 11 - Microscopia eletrônica confocal de biofilmes monoespécie.	55
Figura 12 - Microscopia eletrônica confocal de biofilmes mistos.....	56
Figura 13 - Fotomicrografia da linhagem L929 tratada com CBCC após 72 horas. ..	60
Figura 14 - Fotomicrografia da linhagem HaCat tratada com CBCC após 72 horas.	61

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1 - Cinética de morte microbiana após exposição temporal ao extrato.....	42
Gráfico 2 - Biofilmes monoespécie expostos a diferentes concentrações do extrato	44
Gráfico 3 - Biofilmes monoespécie pré-formados expostos a diferentes concentrações de CBCC.	47
Gráfico 4 - Inibição de formação de biofilmes mistos cultivados na presença de diferentes concentrações de CBCC.	49
Gráfico 5 - Biofilmes mistos pré-formados expostos a diferentes concentrações do extrato.	51
Gráfico 6 - Efeito de CBCC sobre a viabilidade celular de L929.	59
Gráfico 7 - Efeito de CBCC sobre a viabilidade celular de HaCat.	59

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Taxonomia do <i>Crotonblanchetianus</i>	26
Tabela 2 - Concentração Inibitória Mínima (CIM) e Concentração Bactericida Mínima (CBM) do extrato frente a <i>Candida albicans</i> , <i>Staphylococcus aureus</i> e <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	40
Tabela 3 - Concentração Inibitória Mínima (CIM) e Concentração Microbicida Mínima (CMM) do extrato.....	40

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ANOVA	Análise de Variância
ATCC	American Type Culture Collection
BCRJ	Banco de Células do Rio de Janeiro
CBCC	<i>Croton blanchetianus</i> casca caule
CBM	Concentração Bactericida Mínima
CIM	Concentração Inibitória Mínima
CV	Cristal de Violeta
DMEM	Meio Dulbecco MEM
DMSO	Dimetilsulfóxido
IACS	Infecções Associadas aos Cuidados de Saúde
INCS	Infecção da Corrente Sanguínea Nosocomial
IRAS	Infecções Relacionadas à Assistência à Saúde
ITU	Infecção no Trato Urinário
MAS	Agar Sal Manitol
MEV	Microscopia Eletrônica de Varredura
MRSA	Meticilin-resistant Staphylococcus Aureus
OMS	Organização Mundial da Saúde
PBS	Phosphate-Buffered Saline
PIA	Pseudomonas Isolation Agar
QQ	Quorum Quenching
QS	Quorum Sensing
SBF	Soro Fetal Bovino
SDA	Sabouraud Dextrose Agar
SDB	Sabouraud Dextrose Broth
TSA	Trypticase Soy Agar
TBS	Trypticase Soy Broth
UFCs	Unidades Formadoras de Colônias

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	14
1.1	Infecções associadas aos cuidados de saúde (IRAS)	14
1.2	Biofilmes	15
1.3	Biofilme multiespécie	17
1.4	IRAS por biofilmes de <i>Staphylococcus aureus</i>	20
1.5	IRAS por biofilmes de <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	21
1.6	IRAS por biofilmes de <i>Candida albicans</i>	22
1.7	IRAS por biofilmes multiespécie	22
1.8	Produtos Naturais	23
1.8.1	Gênero <i>Croton</i>	25
1.8.2	<i>Croton blanchetianus</i>	25
1.8.3	Diterpeno clerodano	27
2	OBJETIVOS	30
2.1	Geral	30
2.2	Específicos	30
3	MATERIAIS E MÉTODOS	32
3.1	Extrato hidroalcolólico da casca do caule de <i>Croton blanchetianus</i>	32
3.2	Microrganismos e condições de cultura	32
3.3	Linhagens celulares e condições de cultura	32
3.4	Determinação da concentração inibitória mínima (CIM) e da concentração microbicida mínima (CMM) do extrato	33
3.5	Ensaio do tempo de morte microbiana na presença de CBCC	34
3.6	Ensaio sobre a formação do biofilme	34
3.7	Quantificação da biomassa	35
3.8	Determinação da atividade metabólica no biofilme	35
3.9	Contagem de células viáveis dos biofilmes	36
3.10	Ensaio sobre biofilmes pré-formados	36
3.11	Ensaio sobre biofilmes multiespécie	36
3.12	Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)	37
3.13	Microscopia Eletrônica Confocal a Laser	38
3.14	Ensaio de viabilidade celular	38
3.15	Análises Estatísticas	39

4	RESULTADOS E DISCUSSÃO	40
4.1	Atividade antimicrobiana de CBCC sobre células planctônicas	40
4.1.1	<i>Concentração inibitória mínima, concentração microbicida mínima e concentração microbicida mínima</i>	40
4.1.2	<i>Ensaio do tempo de morte microbiana na presença do extrato</i>	41
4.2	Atividade antimicrobiana de CBCC sobre biofilmes antibiofilme	42
4.2.1	<i>Atividade de CBCC sobre a formação de biofilmes monoespécie</i>	42
4.2.2	<i>Atividade de CBCC sobre biofilmes pré-formados monoespécie</i>	45
4.2.3	<i>Atividade de CBCC sobre a formação de biofilmes mistos</i>	48
4.2.4	<i>Atividade de CBCC sobre biofilmes pré-formados mistos</i>	50
4.3	Análise dos biofilmes tratados com CBCC através de microscopias eletrônicas	52
4.3.1	<i>Microscopia eletrônica de varredura (MEV)</i>	52
4.3.2	<i>Microscopia confocal a laser</i>	54
4.4	Viabilidade celular e toxicidade de CBCC	57
5	CONCLUSÃO	63
	REFERÊNCIAS	64

1 INTRODUÇÃO

1.1 Infecções associadas aos cuidados de saúde (IRAS)

As infecções associadas aos cuidados de saúde (IRAS) são adquiridas pelos pacientes quando recebem cuidados e são os eventos adversos mais frequentes que afetam a segurança dos pacientes em todo o mundo. As IRAS comuns incluem infecções de urina, tórax, sangue e feridas. As IRAS são causadas principalmente por microrganismos resistentes aos antimicrobianos comumente usados, que podem ser multirresistentes (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2018).

De acordo com a Organização Mundial de Saúde, a qualquer momento existem mais de 1.4 milhões de pessoas doentes com IRAS, representando entre 5 e 10% de todos os doentes admitidos em hospitais em países desenvolvidos e até 25% em países em desenvolvimento (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2018).

As taxas de mortalidade relacionadas à infecção hospitalar variam conforme a topografia, a doença de base, etiologia, entre outros. Algumas regiões brasileiras, o índice de mortalidade por sepse pode chegar a 70%. Estima-se que 400 mil novos casos são diagnosticados por ano e 240 mil pessoas morrem, anualmente, nas UTIs brasileiras após terem seus quadros de infecção agravados. (INSTITUTO LATINO AMERICANO DE SEPSE, 2019). É de extrema relevância no contexto da vigilância e monitoramento das IRAS a resistência aos antimicrobianos, que vem sendo discutida em todo o mundo e consiste em um dos mais sérios problemas de saúde da atualidade, uma vez que infecções causadas por bactérias resistentes a múltiplas classes de antimicrobianos tem se tornado cada vez mais comum. Desde 2001 a Organização Mundial da Saúde (OMS) chama a atenção para um problema mundial: a crescente resistência bacteriana aos antimicrobianos, especialmente para as infecções associadas aos cuidados à saúde (AGENCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA, 2016).

O mau uso desses fármacos leva ao aparecimento de microrganismos resistentes, que se acumulam e se disseminam, representando um sério risco para a população, por reduzirem as opções de fármacos efetivos para o tratamento de

infecções, aumentarem as complicações clínicas de pacientes hospitalizados e prolongar o tempo de estadia hospitalar, elevando os custos direcionados à recuperação dos pacientes doentes e com saúde pública (SIQUEIRA, 2004).

A resistência bacteriana é considerada um problema de saúde pública mundial, realidade para a qual têm sido propostas diversas iniciativas de controle. Assim, a contínua emergência de microrganismos resistentes nas instituições de saúde constitui-se um grande desafio mobilizando órgãos nacionais e internacionais de vigilância e controle epidemiológicos (OLIVEIRA, 2009).

1.2 Biofilmes

Os biofilmes são comunidades microbianas complexas estabelecidas em uma ampla variedade de superfícies que são geralmente associadas a uma matriz extracelular composta por vários tipos de biopolímeros (ABEE *et al.*, 2010).

A formação do biofilme ocorre por uma série de eventos sequenciais, em que a adesão inicial de bactérias planctônicas à superfície (processo reversível) é seguida por subsequente proliferação e acúmulo de camadas de células e, finalmente, pela formação da comunidade microbiana (processo irreversível), embebida em matriz de exopolissacarídeo produzida por si mesma (CAIXETA, 2008).

Os biofilmes podem ser produzidos por várias espécies ou por uma única espécie microbiana. O estado do biofilme aumenta a resistência dos microrganismos residentes aos agentes antimicrobianos, produzindo substâncias poliméricas extracelulares (CAO *et al.*, 2019).

A dinâmica de formação de um biofilme ocorre em fases distintas. Inicialmente os colonizadores primários aderem a superfície e passam a se desenvolver originando pequenas colônias sintetizando matriz extracelular que serve de substrato para aderência para microrganismos secundários que podem ou não ser da mesma estirpe formando agregados (RICKARD *et al.*, 2003). Após o biofilme formado, ocorre a troca de substâncias entre o meio interno e externo através do gradiente de concentração, e pelos sinalizadores produzidos pelos microrganismos, fazendo com que o EPS seja seletivo, e as bactérias mais internas

tenham o metabolismo menos ativo do que as bactérias das extremidades (Figura 1). Durante a patogênese, os microrganismos liberam sinais que regulam os genes relacionados à virulência e patogenicidade. Tais bactérias coordenam seu comportamento virulento em um fenômeno dependente da densidade celular denominado *quorum sensing* (QS). Por outro lado, os micróbios interferem no sistema QS, extinguindo os sinais, denominados *quorum quenching* (QQ). Como consequência da QS interrompida, os patógenos se tornam suscetíveis a antibióticos e medicamentos (KALIA; PUROHIT, 2011) (Figura 2).

A etapa de dispersão das porções do biofilme conhecidos por erosão, em acontece em determinadas situações onde o ambiente pode não se encontrar favorável, por alterações ambientais, devido a programação celular exercidas pelas próprias bactérias, processos de abrasão ou devido a constantes colisões que ocorrem entre a superfície do biofilme e o meio em que se encontra (XAVIER *et al*, 2005; MENOITA *et al.*, 2012; TRENTIN; GIORDANI; MACEDO, 2013).

Figura 1 - Estrutura do biofilme bacteriano e suas fases de formação.



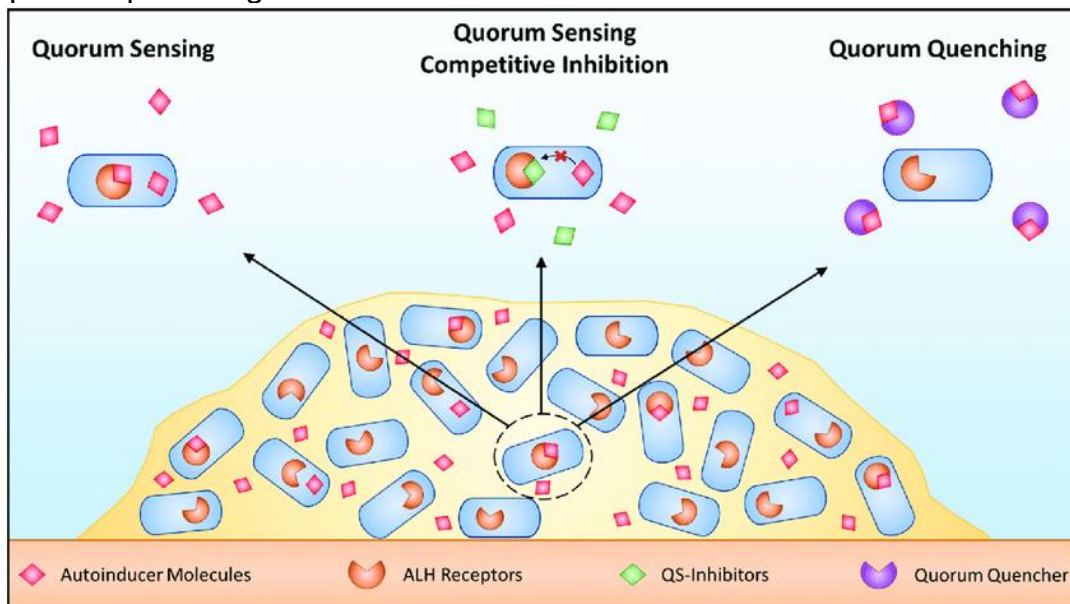
Fonte: Adaptado de MENOITA *et al.* (2012).

Os exopolissacarídeos da substância polimérica extracelular (EPS) são considerados componentes importantes que determinam a estrutura e a integridade funcional do biofilme microbiano. A EPS age como barreira defensiva, protegendo as

células para que não sejam arrastadas pelo fluxo de substâncias, auxiliando a célula a resistir a condições de stress múltiplo, tais como a diminuição de nutrientes e água, a presença de biocidas e outros agentes antimicrobianos e condições ambientais. Em alguns casos, o SPE é capaz de captar cátions, metais e toxinas, conferindo, também, proteção contra radiações UV, alterações de pH, choques osmóticos etc. Assim, a matriz polimérica é a responsável pela morfologia, estrutura, coesão, integridade funcional dos biofilmes e a sua composição determina a maioria das propriedades físico-químicas e biológicas dos biofilmes (FLEMMING; NEU; WINGENDER, 1999).

Existe também a percepção do biofilme não como uma massa de bactérias e/ou outros microrganismos, mas essencialmente uma massa composta majoritariamente por substância polimérica extracelular, na qual se alojam e desenvolvem estas entidades e é um fator fundamental na adequação da estratégia de tratamento (MENOITA *et al.*, 2012).

Figura 2 - Representação didática das interações de quorum sensing e quorum quenching no biofilme maduro.

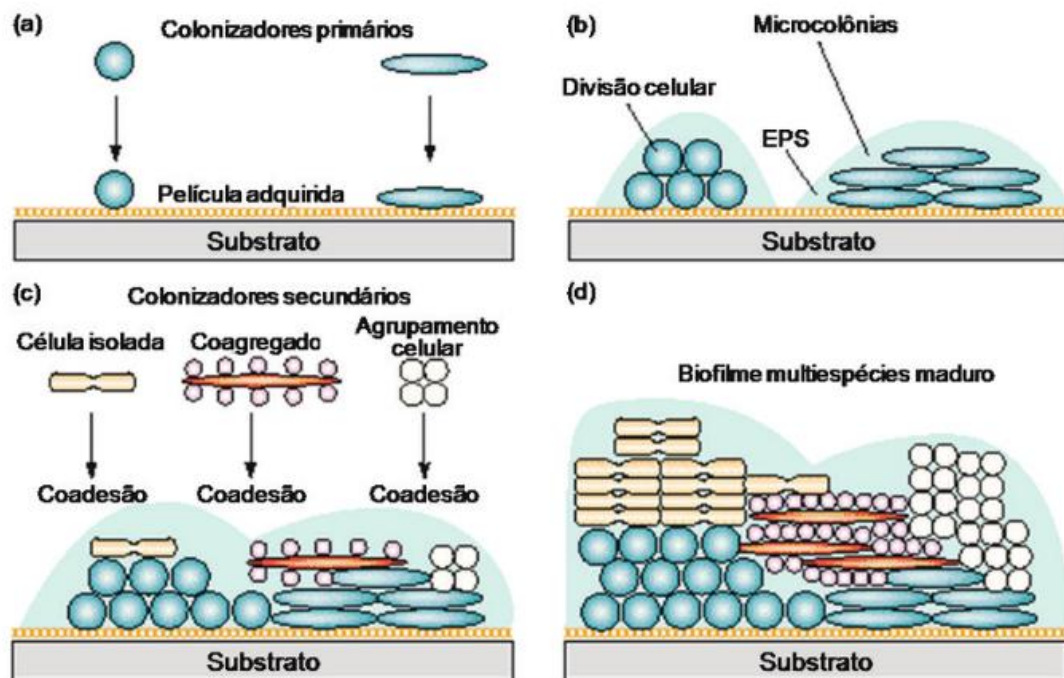


Fonte: Beitelshes *et al.* (2018).

1.3 Biofilme multiespécie

Biofilmes multiespécie podem ser definidos como um conjunto variado de organismos (fungos, bactérias e vírus) que estabelecem uma relação entre si e são revestidos por uma matriz, geralmente constituída por polissacarídeos (PETERS *et al.*, 2012). As etapas da formação do biofilme multiespécie são: (Figura 3-a) a adesão dos colonizadores primários; (Figura 3-b) crescimento e divisão celular e produção da matriz de polissacarídeo extracelular (EPS); (Figura 3-c) co-adesão de células individuais, células ou grupos de células idênticas para formar o biofilme jovem multiespécie e (Figura 3-d) a maturação do biofilme multiespécie.

Figura 3 - Etapas da formação de um biofilme multiespécie.



Fonte: Adaptado de Rickard *et al.* (2003).

Existe um aumento crescente no interesse em estudar as interações entre *Candida* e bactérias, já que estas podem variar de um simples antagonismo e parasitismo, a associações do tipo patogênicas (EL-AZIZI; STARKS; KHARDOR, 2004).

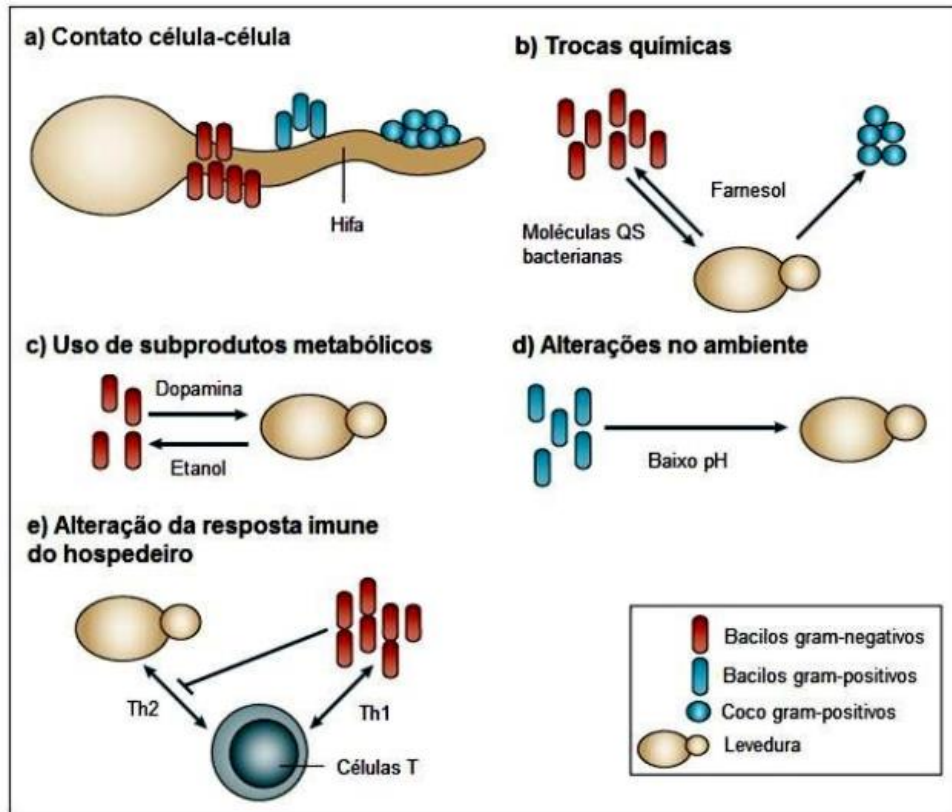
C. albicans é capaz de formar biofilmes polimicrobianos com diferentes espécies microbianas. Muitas espécies bacterianas demonstraram estabelecer uma relação sinérgica com *C. albicans*: por exemplo, em alguns casos, *C. albicans* pode

aumentar a resistência bacteriana aos antibióticos, ou permitir a sobrevivência e crescimento de bactérias anaeróbicas em condições aeróbicas. A virulência desses patógenos oportunistas também pode ser influenciado por interações entre os reinos: por exemplo, a associação entre *C. albicans* e *S. aureus* aumenta a letalidade de infecções. Essas observações apontam que o estudo inter-reino nas interações dentro de biofilmes é de extrema importância (COSTA-ORLANDI, 2017).

Estudos *in vitro* de interações físicas indicam que *P. aeruginosa* se liga preferencialmente a forma filamentosa da *C. albicans* (HOGAN; KOLTER, 2002). A capacidade das bactérias em distinguir entre os diferentes morfotipos de fungos são provavelmente devidos à especificidade na parede celular das proteínas de superfície (BRAND *et al.*, 2008, CHAFFIN *et al.*, 1998). Como por exemplo, as manoproteínas localizadas ao longo da superfície dos filamentos que permitem que as condições ácido-base sejam favoráveis facilitando a aproximação das células bacterianas (EKATERINA S. OVCHINNIKOVA *et al.*, 2012); ligação à quitina por *P. aeruginosa* a proteína também desempenha um papel sinalizador facilitando a adesão da bactéria aos filamentos de *C. albicans* alimentando-se dos nutrientes do fungo quando o meio encontra-se deficiente de nutrientes (Ovchinnikova *et al.*, 2013).

Peleg, Hogan e Mylonakis (2010) afirmam que os microrganismos que habitam um ambiente polimicrobiano aumentam seus mecanismos de resistência através do contato célula-célula, trocas químicas, utilização de subprodutos, alterando a resposta imune do hospedeiro, aprofundando nosso conhecimento a respeito da patogênese microbiana, favorecendo novas probabilidades de estudo sobre novas vias de estudo para desenvolvimento de novas drogas antimicrobianas (Figura 4).

Figura 4 - Representação didática das interações entre fungos e bactérias.



Fonte: Adaptado de Peleg, Hogan e Mylonakis (2010).

1.4 IRAS por biofilmes de *Staphylococcus aureus*

Das muitas espécies do gênero *Staphylococcus*, *S. aureus* é considerado um dos patógenos mais importantes responsáveis por infecções nosocomiais. São cocos gram-positivos, sem formação de esporos, catalase e coagulase-positivos, imóveis, anaeróbios facultativos (BROWN *et al.*, 2012).

A bactéria *S. aureus* é mais recorrente em ambientes hospitalares. *S. aureus* resistente à metilina (MRSA) causa até 60% de infecção no trato urinário (ITU) em hospitais (SIDDIQUI; KOIRALA, 2019). A América do Norte tem a maior taxa de *S. aureus* resistente à metilina entre 1998-2004 (ELLIOTT; JUSTIZ-VAILLANT, 2019).

No cenário clínico, *S. aureus* forma biofilmes nas superfícies do cateter (cateteres intravenosos, cateteres urinários, cateteres de teste etc.) e dispositivos médicos implantados (derivações de fluidos, próteses articulares e próteses

articulares etc.) (SURESH; BISWAS; BISWAS, 2018). Um estudo de Herrmann *et al.* (1988) mostra que *S. aureus* aumentou a aderência aos dispositivos de fibronectina, fibrinogênio e laminina por via intravenosa, ou pode ser um dos fatores que causam a patogênese da infecção. As infecções são iniciadas quando uma violação da barreira cutânea ou da mucosa permite o acesso a esse filtro de tecido nos tecidos adjacentes ou na corrente sanguínea (LOWY, 1998).

1.5 IRAS por biofilmes de *Pseudomonas aeruginosa*

Pseudomonas aeruginosa contribui com 11% de todas as infecções hospitalares, o que resulta em altas taxas de mortalidade e morbidade. É um organismo gram-negativo não fermentador que causa doenças especialmente entre pessoas comprometidas pelo sistema imunológico. Os locais de colonização são rim, trato urinário e trato respiratório superior. É uma causa de infecções cirúrgicas e de feridas, pneumonia, fibrose cística e bacteremia. Alguns fatores importantes de virulência são aderências, hemolisinas, exotoxinas, proteases e sideróforos (KHAN; AHMAD; MEHBOOB, 2015).

P. aeruginosa é conhecido por sua capacidade de se disseminar em dispositivos médicos, ambiente hospitalar e até mesmo desinfetantes (XU *et al.*, 2013). Essa bactéria tem uma característica marcante de ser resistente a uma enorme variedade de antimicrobianos (CARMELI *et al.*, 1999), e as infecções causadas por esse organismo são mais difíceis de erradicar ou controlar por causa disso. Além disso, *P. aeruginosa* pode se tornar resistente a antibióticos amplamente utilizados na clínica, utilizando mecanismos de resistência, como mostra o estudo de Riou *et al.* (2015), em que a bactéria pode ter uma superexpressão de genes que codificam transportadores de efluxo quando em contato com alguns antibióticos amplamente utilizados na prática clínica, e essa superexpressão aumenta a média de CIMs que podem estar associadas à resistência a vários medicamentos. Além dos problemas mencionados, *P. aeruginosa* é capaz de formar biofilme, que é um importante fator de virulência, causando maior resistência aos antimicrobianos (ROCHA *et al.*, 2019). Balasubramanian *et al.* (2012), mostra que, com o tempo, o

biofilme de *P. aeruginosa* apresenta um aumento de sua resistência à piperacilina em aproximadamente 50%, sendo superior à resistência adquirida pelas células planctônicas (25%).

1.6 IRAS por biofilmes de *Candida albicans*

Candida albicans é o segundo maior agente de infecção por fungos do mundo (BROWN *et al.*, 2012) e é responsável pela candidíase, que está entre as terceira e quarta infecções mais comuns no mundo (PFALLER; DIEKEMA, 2007).

Existem várias manifestações infecciosas de *Candida* spp, as principais são por *Candida albicans*, associadas à formação de biofilme em dispositivos médicos implantáveis (BROWN, 2012; SIDDIQUI; KOIRALA, 2019; ELLIOTT; JUSTIZ-VAILLANT, 2018). Diferentes biomateriais podem ser utilizados como suporte para a formação de biofilme de *C. albicans* e, de maneira alarmante, o aumento da incidência de candidíase é praticamente paralelo ao uso crescente de uma ampla variedade de dispositivos médicos (XU *et al.*, 2013).

Os biofilmes de *Candida* têm importantes repercussões clínicas devido à sua maior resistência à terapia antifúngica e à capacidade das células de biofilme de resistir às defesas imunológicas do hospedeiro (RAMAGE *et al.*, 2005). De fato, *C. albicans* possui vários mecanismos de resistência, como por exemplo, receptores de reconhecimento de células imunes do hospedeiro (KERNIEN *et al.*, 2017; MITCHELL; ZARNOWSKI; ANDES, 2016), inibição do amortecimento da migração de células de defesa, inibição de mecanismos de imunidade do hospedeiro e amortecimento da migração de macrófagos (JOHNSON *et al.*, 2016), a fim de aliviar ou cessar a ação de antifúngicos e o sistema imunológico do hospedeiro (KATRAGKOU *et al.*, 2010). Assim, os biofilmes dessa espécie têm um impacto adverso na saúde dos pacientes, com frequência e gravidade crescentes (BECK-SAGUE; JARVIS, 1993; WILSON *et al.*, 2002).

1.7 IRAS por biofilmes multiespécie

Embora seja responsável por doenças que são notavelmente diferentes em termos de fisiopatologia e gravidade, *Staphylococcus* coagulase-negativo e *Staphylococcus aureus* estão entre as espécies mais comumente isoladas junto com *C. albicans*. *C. albicans* e *S. aureus* podem ser isolados independentemente ou co-isolados de vários dispositivos médicos, como dentaduras, próteses de voz, implantes, tubos endotraqueais, tubos de alimentação e, mais comumente, cateteres (HARRIOTT; NOVERR, 2009). De acordo com dados da literatura, 27% das infecções nosocomiais da corrente sanguínea causados por *C. albicans* são polimicrobianas, sendo *S. aureus* o terceiro organismo mais comum isolado em conjunto com *C. albicans*. Como outro exemplo, ele também foi relatado que espécies de *Candida* e *S. aureus* podem causar superinfecções nos pulmões de pacientes com fibrose cística, formando biofilmes mistos. No geral, biofilmes polimicrobianos formados por esses microrganismos em dispositivos médicos implantados (IMDs) bem como nos tecidos do hospedeiro são uma preocupação real (KLOTZ *et al.*, 2007; SHIRTLIFF; PETER; JABRA-RIZK, 2009).

Por serem mais difíceis de ser tratadas, as infecções ocasionadas por biofilmes polimicrobianos, a interação entre bactérias e fungos podem apresentar propriedades distintas das infecções ocasionadas por uma única espécie de microrganismo. Esses biofilmes podem ser mais resistentes como resultado da composição de uma matriz mais complexa, e supõe-se que este tipo de infecção apresente perfis diferentes de resistência a antibióticos (WARGO; HOGAN, 2006).

Estudos sobre interações fungo-bacterianas fornecem *insights* sobre o espectro de interações que podem ocorrer entre microrganismos, e isso oferece ideias para a consideração de estratégias de tratamento do paciente e no campo da prospecção de medicamentos (LINDSAY; HOGAN, 2014).

1.8 Produtos Naturais

A natureza, de um modo geral, é a responsável pela produção da maioria das substâncias orgânicas conhecidas, entretanto, o reino vegetal é responsável pela maior parcela da diversidade química conhecida e registrada na literatura. A variedade e a complexidade das micromoléculas que constituem os metabólitos

secundários de plantas e organismos marinhos ainda são inalcançáveis por métodos laboratoriais. Isto seria a consequência direta de milhões de anos de evolução, atingindo um refinamento elevado de formas de proteção e resistência às intempéries do clima, poluição e predadores (MONTANARI, 2001).

Por possuir a mais rica biodiversidade do mundo com aproximadamente 20% do número total de espécies, o Brasil detém um imenso patrimônio genético, já raro nos países desenvolvidos. Atualmente apresenta valor econômico inestimável principalmente no campo de desenvolvimento de novos medicamentos (CALIXTO, 2003). Vários estudos sugerem que extratos de plantas exibem atividade antimicrobiana e antibiofilme. Atualmente, os produtos vegetais têm encontrado ampla aplicação na área médica e alimentícia como alternativas à terapia convencional. Extratos de plantas de várias espécies vegetais, incluindo ervas culinárias comuns e de uso na medicina popular, estão sendo estudados extensivamente, para isolar e caracterizar seus compostos bioativos (SHAN *et al.*, 2007).

Extratos vegetais têm sido utilizados para uma ampla variedade de propósitos por muitos anos; recentemente, eles geraram amplo interesse como fonte de antimicrobianos naturais, pois tradicionalmente, os seres humanos usam extratos brutos de diferentes partes das plantas como casca, folhas, semente e caule como agentes curativos, sendo também utilizado para tratamento de doenças infecciosas causadas por micróbios resistentes a antibiótico por existir um consenso geral que os metabólitos secundários presentes nos extratos das plantas podem inibir bactérias, fungos e vírus (RAKHOLIYA; KANERIA; CHANDRA, 2013).

Os metabólitos secundários desempenham um papel fundamental nas plantas, regulando, equilibrando, adaptando-se a habitats, fatores físicos e climáticos e protegendo contra patógenos e predadores. Em vista da grande extensão territorial do Brasil e dos diferentes habitats em que as plantas tiveram que se adaptar durante sua evolução, é sabido que a flora brasileira possui uma diversidade química extraordinária, porém pouco explorada, que poderia ser usada para o desenvolvimento de biomassa e produtos à base de plantas, incluindo produtos

farmacêuticos, cosméticos, suplementos alimentares e pesticidas agrícolas (VALLI, RUSSO; BOLZANI, 2018).

1.8.1 Gênero *Croton*

Croton é um amplo gênero da família Euphorbiaceae, compreendendo cerca de 1.300 espécies de árvores, arbustos e ervas distribuídos em regiões tropicais e subtropicais de ambos os hemisférios. A química do *Croton* é consideravelmente diversa sendo os terpenoides os constituintes metabólicos secundários predominantes no gênero, principalmente os diterpenos, como ésteres de forbol, clerodanos, labdanos, caurano, traquilobanos, pimarano etc. (SALATINO *et al.*, 2007). Várias espécies há muito tempo desempenham papel importante nos usos tradicionais de plantas medicinais, apresentando atividade biológica que incluem tratamento de câncer (PEREIRA *et al.*, 2002), diabetes (CAMPOS *et al.*, 2002), hipertensão (GUERREIRO *et al.*, 2001), inflamação (AGUILAR-GUADARRAMA; RIOS, 2004), úlceras (MURILLO *et al.*, 2001), disenteria (NGAMROJNAVANICH *et al.*, 2003), entre outras enfermidades.

1.8.2 *Croton blanchetianus*

Croton blanchetianus Baill (Figura 5), conhecida popularmente como marmeleiro comum, marmeleiro preto, marmeleiro do mato e mermeleiro, ocorre em vegetação de Caatinga (Figura 6) e apresenta potencial para uso terapêutico, como em casos de edema, hemorragia, hemoptise, dor de estômago, vômitos e diarreia (FRANCO; BARROS, 2006; GOMES, 2006; MATOS, 1999). Na Tabela 1 é descrita a taxonomia da espécie *Croton blanchetianus*.

Tabela 1 - Taxonomia do *Crotonblanchetianus*.

Nome científico	<i>Crotonblanchetianus</i>
Autoria	Baill
Sinônimo	<i>Crotonsonderianus</i> Müll. Arg
Família	Euphorbiacea
Gênero	Croton
Espécie	<i>Crotonblanchetianus</i>

Fonte: SiBBr (2019).

Figura 5 - Aspectos gerais das folhas, inflorescências e frutos do *Crotonblanchetianus*.



Fonte: RCPol (2019).

Figura 6 - Distribuição geográfica do *Croton blanchetianus*.



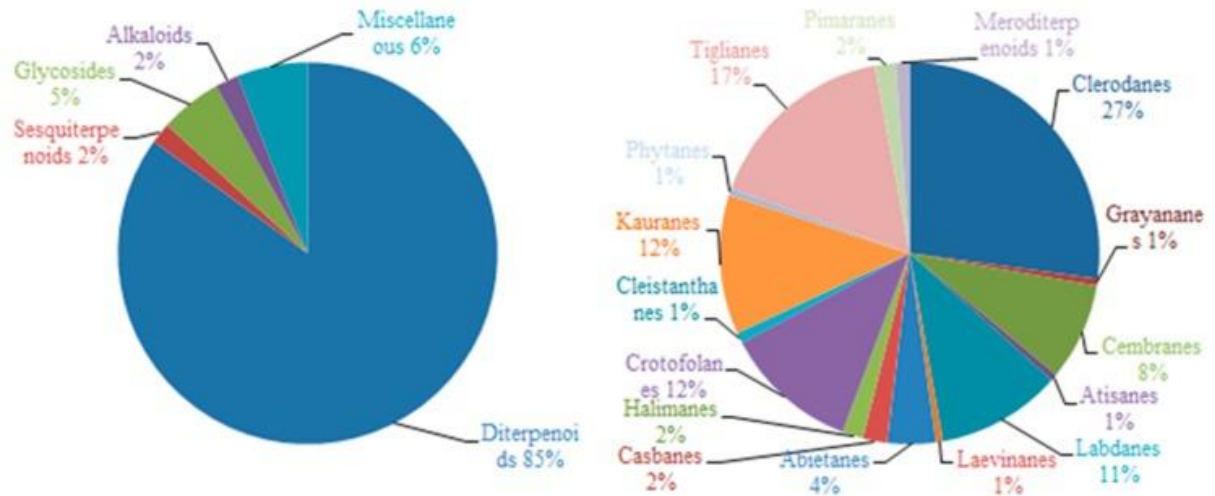
Fonte: SiBBr (2019).

1.8.3 Diterpeno clerodano

Os clerodanos são a classe de diterpenos mais diversificada em eudicotiledôneas (Figura 7). Com mais de 800 compostos isolados, possuem atividade biológica com ação antibacteriana, antiviral, antitumoral, antiulcérica e psicotrópica (GRYNBERG *et al.*, 1999; MACIEL *et al.*, 1998; CAMPOS *et al.*, 2010).

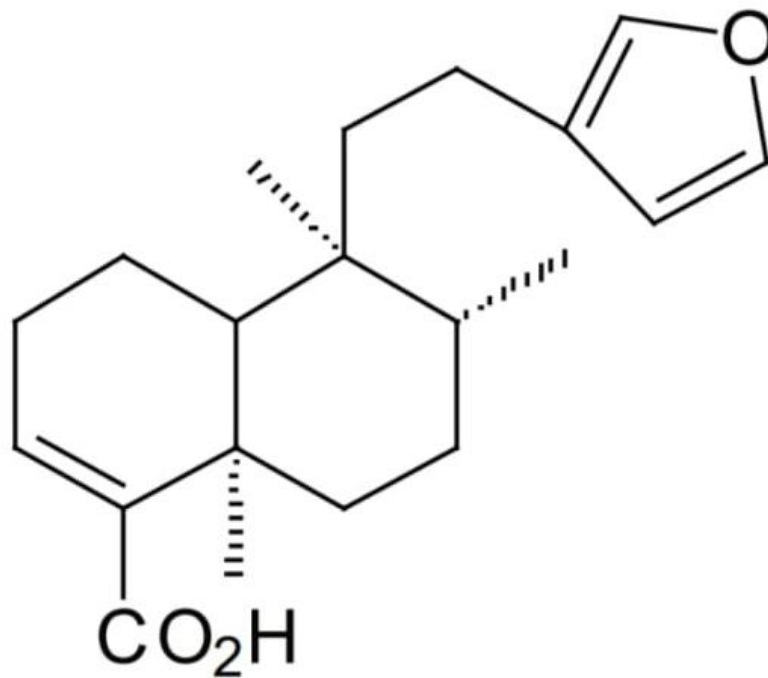
Silveira (1991) isolou e caracterizou o ácido hardwikiico (Figura 8) – que é da classe dos clerodanos com fórmula $C_{20}H_{28}O_2$ e massa molar 316,4g/mol – a partir da resina orgânica extraída das raízes do *Croton blanchetianus* que apresentou atividade antimicrobiana em ensaios biológicos qualitativos.

Figura 7 - Constituintes metabólicos secundários do gênero *Croton*.



Fonte: Wen-Hui Xu *et al.* (2018).

Figura 8 - Estrutura do ácido hardwickiico.



Fonte: Elaborado pela autora.

Com surgimento de bactérias patogênicas resistentes a antibióticos e multidrogas criou-se a necessidade do desenvolvimento de novos medicamentos e alvos de drogas, por conseguinte, medidas para evitar a resistência bacteriana, como o uso racional dos antibióticos, prevenção de infecções bacterianas, controle e

prevenção da disseminação de microrganismos resistentes são essenciais, assim como a busca por novos metabólitos ativos contra diferentes microrganismos patogênicos devem ser ativas e contínuas (GUIMARÃES; MOMESSO; PUPO, 2010; DUARTE *et al.*, 2009).

Neste contexto, muitos estudos têm demonstrado que o próprio meio ambiente funciona como um grande reservatório de genes de resistência a antimicrobianos. A resistência a antibióticos tem sido observada em vários ambientes aquáticos incluindo rios e áreas costeiras, esgoto doméstico, esgoto hospitalar, sedimentos, águas superficiais, lagos, oceanos e água potável, bem como em solos (CAUMO *et al.*, 2010).

Considerando a importância dos extratos de Croton ricos em metabólitos secundários como fonte de matéria-prima para prospecção de novos medicamentos existe a necessidade de aprofundamento nesse tipo de estudo, visto que, o aumento da incidência de infecções microbianas resistentes a antibióticos adquiridas tanto na comunidade quanto nos hospitais tem chamado a atenção da comunidade de saúde.

2 OBJETIVOS

2.1 Geral

Avaliar o potencial biotecnológico extrato composto majoritariamente por ácido hardwickiico (CBCC) isolado de *Croton blanchetianus* como agente preventivo e controlador em células planctônicas, biofilmes mono espécie e biofilmes multiespécie.

2.2 Específicos

- a) Avaliar a atividade inibitória do crescimento espécies bacterianas como *S. aureus* ATCC700698, *S. aureus* ATCC25923, *P. aeruginosa* ATCC 9027, *P. aeruginosa* ATCC10145 quando expostos ao extrato;
- b) avaliar a atividade microbicida mínima de espécies bacterianas como *S. aureus* ATCC700698, *S. aureus* ATCC25923, *P. aeruginosa* ATCC 9027, *P. aeruginosa* ATCC10145 quando expostos ao extrato;
- c) avaliar a atividade microbicida mínima de da espécie fungica *Candida albicans* ATCC90028 quando expostos ao extrato;
- d) avaliar a atividade inibitória do crescimento da espécie fungica *Candida albicans* ATCC90028 quando expostos ao extrato;
- e) avaliar a inibição da formação de biofilmes monoespécie de *S. aureus* ATCC700698, *S. aureus* ATCC 25923, *P. aeruginosa* ATCC 9027, *P. aeruginosa* ATCC10145.
- f) avaliar a inibição da formação de biofilmes monoespécie de *Candida albicans* ATCC90028
- g) verificar a inibição da formação de biofilme misto entre espécies bacterianas e *Candida* na presença de extrato;
- h) avaliar a atividade do extrato frente a biofilmes bacterianos monoespécies de *S. aureus* ATCC700698, *S. aureus* ATCC 25923, *P. aeruginosa* ATCC 9027, *P. aeruginosa* ATCC10145 pré-formados.

- i) avaliar a atividade do extrato frente a biofilmes monoespécie de *Candida albicans* ATCC90028 pré-formado
- j) avaliar a atividade do extrato frente a biofilmes multiespécie pré-formados
- k) examinar as possíveis alterações morfológicas na estrutura dos microrganismos expostos ao extrato através de microscopia eletrônica de varredura;
- l) examinar as possíveis alterações na viabilidade dos microrganismos expostos ao extrato através de microscopia eletrônica confocal utilizando o kit live/dead;
- m) investigar a toxicidade do CBCC frente fibroblastos e queratinócitos.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Extrato hidroalcoólico da casca do caule de *Croton blanchetianus*

O extrato da casca do caule com o ácido hardwickiico como componente majoritário foi cedido pelos professores Dr. Edilberto Silveira e Dr. Francisco Serra do Laboratório de Análise Fitoquímica de Plantas Medicinais (LAFIPLAN I) – Universidade Federal do Ceará.

3.2 Microrganismos e condições de cultura

Os microrganismos utilizados neste estudo incluíram bactérias gram-positivas: *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 e *Staphylococcus aureus* ATCC 700698, bactéria gram-negativa: *Pseudomonas aeruginosa* ATCC10145 e *Pseudomonas aeruginosa* ATCC9027, leveduras: *Candida albicans* ATCC90028 Coleção Cultura (ATCC).

As bactérias foram cultivadas em meio Trypticase Soy Agar (TSA, KASVI) e incubadas a 37°C por 24h. Após o crescimento em meio sólido, uma colônia isolada foi removida e inoculada em 10 mL de Trypticase SoyBroth (TSB, KASVI) e incubada por 18 h a 37°C sob agitação constante a 120 rpm. Antes da utilização, a concentração de células de cada inoculo foi ajustado a $2 \cdot 10^6$ células/mL utilizando um espectrofotômetro (620nm) e as curvas de calibração previamente determinada para cada bactéria. As condições de levedura foram as mesmas que as mencionadas anteriormente; no entanto, foi utilizado o meio de cultura Agar de Dextrose Sabouraud e Caldo (SDA e SDB, respectivamente; Kasvi), e a concentração de cada inoculo de levedura foi ajustada a $2 \cdot 10^6$ células/mL na câmara de Neubauer contadas nos 5 quadrantes em diagonal do quadrante central.

3.3 Linhagens celulares e condições de cultura

As estirpes L929 (fibroblastos murinos) e HaCat (queratinócitos humanos), ambas obtidas da ATCC® (American Type Culture Collection, EUA), foram obtidas do Banco de Células do Rio de Janeiro (BCRJ). As células foram cultivadas em frascos de cultura de células T-75 contendo meio DMEM (GE-Hyclone®) suplementado com soro fetal de carne bovina a 10% (SFB) (GIBCO®– Life Technologies), L-glutamina 1%, penicilina 100 U/mL e Estreptomicina 100 µg/mL (GIBCO®– Life Technologies) e mantido a 37°C em uma atmosfera de 95% de umidade e 5% de CO₂. O meio foi trocado a cada três dias e após atingir 80% de confluência, as células foram submetidas a tripsina (tripsina a 0,025%/EDTA a 0,1%) para ensaios de subcultura e/ou viabilidade.

3.4 Determinação da concentração inibitória mínima (CIM) e da concentração microbicida mínima (CMM) do extrato

A avaliação da atividade antibacteriana do CBCC foi realizada segundo o ensaio de microdiluição em caldo, em placas de poliestireno de 96 poços de fundo plano de acordo com as normas sugeridas pelo CLSI (2017), com algumas modificações. Para a determinação da CIM, os poços da linha A (1 a 3) da placa foram preenchidos inicialmente com 200 µL do CBCC, sendo a concentração inicial de 1mg/mL. Em seguida, realizou-se a diluição seriada na base dois para obtenção de diferentes concentrações, que variaram entre 500 µg/mL a 7,8 µg/mL. Posteriormente, 100 µL da suspensão bacteriana já previamente ajustada na concentração de $2 \cdot 10^6$ UFC/mL, foi adicionada na placa, com conseqüente diminuição na concentração do CBCC e da suspensão bacteriana, ficando as concentrações finais entre 500 e 7,8 µg/mL para o CBCC e de $1 \cdot 10^6$ UFC/mL para a suspensão bacteriana, obtendo-se um volume final de 200 µL, sendo as placas incubadas por 24 horas, a 37°C. A avaliação do crescimento bacteriano foi mensurada através da turbidez dos poços com auxílio do leitor de microplacas (SpectraMax i3), a um comprimento de onda de 620nm. Considerou-se como CIM (Concentração Inibitória Mínima) a menor concentração da substância teste capaz de inibir visualmente o crescimento bacteriano. Para a determinação da CMM

(Concentração Microbicida Mínima) 24 horas depois da incubação, foram removidos 10 µL da solução contida nos poços que não apresentaram crescimento microbiano, seguido de inoculação em placas de petri com meio TSA. As placas de petri foram incubadas novamente sobre as mesmas condições já descritas. Após o período de 24 horas avaliou-se a presença de unidades formadoras de colônias (UFC) e considerou-se como CMM, a menor concentração da substância teste que inibiu o crescimento visível das UFCs.

3.5 Ensaio do tempo de morte microbiana na presença de CBCC

Para o presente ensaio utilizou-se a metodologia descrita por Kim *et al.* (2011), com modificações. Após as etapas do crescimento das bactérias em caldo, 100µL de suspensão bacteriana na concentração $2 \cdot 10^6$ UFC/mL mais do extrato nas concentrações da CMM e metade da concentração da CMM, foram adicionados nas placas de microtitulação de 96 poços e incubadas a 37°C. Nos tempos de 0, 30min, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 12, e 24 horas, alíquotas de 20 µL 48 das suspensões bacterianas foram coletadas e em seguida, submetidas a uma diluição decimal seriada na base dez, com 180µL de água destilada estéril, em placas de 96 poços de fundo em “U”, para posterior plaqueamento de três alíquotas de 10 µL em meio TSA, e incubação por 24h, a 37°C. Após o tempo de incubação, o número de UFCs foi determinado e os resultados apresentados em termos de Log UFC/mL em uma curva de cinética de morte.

3.6 Ensaio sobre a formação do biofilme

O ensaio foi realizado baseado nos testes de microdiluição seriada, coloração com cristal de violeta (CV) e contagem de UFCs, em placas de poliestireno de 96 poços de acordo com Stepanovic *et al.* (2000) com algumas modificações propostas por Vasconcelos *et al.* (2014). Além das duas metodologias mencionadas acima com relação a formação dos biofilmes, neste ensaio, também avaliou-se a atividade metabólica do biofilme, por meio da redução do sal de

tetrazólio 2,3-bis(2-metoxi-4-nitro-5-sulfofenil)-2H-tetrazólio-5-carboxanilida (XTT) de acordo com metodologia proposta por Xu *et al.* (2016). A preparação das placas para os testes foi similar ao procedimento usado no ensaio de CIM.

3.7 Quantificação da biomassa

A quantificação da biomassa dos biofilmes foi determinada pelo método de coloração com cristal de violeta (CV). Após as 24 horas de incubação as placas foram lavadas com água destilada estéril por três vezes para a retirada das células fracamente aderidas. Posteriormente os poços foram preenchidos com 200 μ L de metanol a 95% por 5 minutos para fixação dos biofilmes. Adicionou-se, então, 200 μ L de cristal de violeta 1% por mais 5 minutos, a 25°C.

Em seguida, o excesso de corante foi removido e as placas lavadas com água destilada. O corante remanescente foi removido com 200 μ L ácido acético a 33% e então a biomassa foi quantificada através da medição da densidade óptica a 590 nm ($D.O_{590}$) com o auxílio de um leitor de microplacas (SpectraMax i3).

3.8 Determinação da atividade metabólica no biofilme

A atividade metabólica do biofilme foi quantificada utilizando o ensaio de redução do sal de tetrazólio XTT (Sigma ChemicalCo., EUA) em cristais de formazan. A princípio foi preparada uma solução estoque de XTT e de PMS de 10 mg/mL e estocado a -20°C, ambos diluídos em PBS (Fosfato 10 mM; NaCl 150 mM; KCl 2,7 mM; pH 7.2–7.4) e estocados na ausência de luz. A montagem das placas de XTT foi realizada conforme a mesma metodologia da montagem de placas para quantificação de biomassa. Após 24 horas de incubação as placas foram lavadas duas vezes com PBS, e posteriormente foi adicionado em cada poço 200 μ L de uma solução de XTT (150 μ g/mL e 10 μ g/mL de PMS). Após a adição da solução, as placas foram incubadas novamente a 37°C durante 3 horas na ausência da luz. A densidade óptica foi mensurada no comprimento de onda de 490 nm ($D.O_{490}$) com auxílio de um leitor de microplacas (SpectraMax i3).

3.9 Contagem de células viáveis dos biofilmes

Após a formação dos biofilmes o meio de cultura foi removido e as placas foram lavadas duas vezes com água destilada estéril, para remoção das células fracamente aderidas. Posteriormente, cada poço foi preenchido com 200 μL de água destilada estéril e submetido ao banho ultrassônico (Cristófoli/EQM-CF) por 8 minutos para o desprendimento das células incrustadas nos biofilmes. Em seguida, uma diluição decimal seriada das amostras em suspensão foram plaqueadas em meio TSA e incubadas sobre as mesmas condições acima citadas, mas por um período de 24 horas. O número de Unidades Formadoras de Colônias foi determinado e os resultados expressos em termos de Log_{10} UFC/mL.

3.10 Ensaio sobre biofilmes pré-formados

Os ensaios de biofilmes pré-formados também foram realizados em placas de 96 poços de poliestireno e fundo plano. As suspensões de células (200 μL de $1 \cdot 10^6$ UFC/mL) foram adicionadas a cada poço e incubadas a 37°C durante 24 horas. Após este período, o meio de cultura foi removido de cada poço e um volume igual do extrato nas concentrações que variaram de 500 a 7,8 $\mu\text{g/mL}$ foi adicionada aos poços, sendo que no controle de bactéria não tratada com este composto, foi adicionado 200 μL de meio de cultura. Após a formação dos biofilmes durante mais 24 horas, o meio foi retirado e cada poço foi lavado com água destilada estéril para remoção das células fracamente aderidas. As mesmas metodologias de quantificação de biomassa, contagem de células viáveis e atividade metabólica utilizadas para avaliação da inibição da formação de biofilmes, também foram usadas para avaliar a ação do composto sobre os biofilmes pré-formados.

3.11 Ensaio sobre biofilmes multiespécie

Os ensaios para avaliar ação do extrato na formação dos biofilmes foram

realizados em placas de polipropileno de 96 poços estéreis. As placas foram preparadas utilizando um procedimento semelhante ao utilizado para os ensaios de crescimento planctônico, com a mesma concentração de células e extrato, assim como os mesmos meios de cultura. Todas as placas foram incubadas a 37°C durante 24 horas para o desenvolvimento do biofilme. Após o crescimento do biofilme, na presença ou ausência do extrato, o conteúdo de cada poço foi removido e os biofilmes foram lavados duas vezes com 200 µL de PBS com o objetivo de remover as células fracamente aderidas. Em seguida, cada poço foi raspado vigorosamente com uma ponteira e as suspensões contidas nos poços foram aliquotadas em tubos de 1,5 mL. O biofilme formado por duas espécies, os microrganismos foram inoculados em meios específicos. *S. aureus* foi inoculado em Agar Sal Manitol (MSA, KASVI) e *P. aeruginosa* em Pseudomonas Isolation Agar (PIA, KASVI), com o objetivo de inibir o crescimento das espécies de *Candida*. As leveduras foram inoculadas em DAS suplementado com 50 µg/mL de ampicilina (Sigma-Aldrich), para inibir o crescimento de *S.aureus* e com 50 µg/mL de tetraciclina (Sigma-Aldrich) para inibir o crescimento de *P. aeruginosa*. As placas foram incubadas a 37°C durante 24 horas. Após esse período, o número total de unidades formadoras de colônias (UFCs) foi enumerado e os resultados foram apresentados em LogUFC/mL da placa de microtitulação.

3.12 Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)

Para a observação de modificações morfológicas dos biofilmes, foram analisadas eletromicrografias obtidas por MEV, de acordo com Vasconcelos *et al.* (2014), com modificações. A inibição da formação de biofilmes mono e multiespécie foram cultivados pelas metodologias e condições anteriormente citadas, no entanto, foram utilizadas lamínulas (Thermo Fisher Scientific, EUA) adicionadas em cada poço da placa de 24 poços. As concentrações do CBCC utilizadas foram o 125 e 62,5 µg/mL. Após o tempo de incubação, os biofilmes foram submetidos as seguintes etapas: 1) as células em suspensão foram removidas e os poços lavados com água estéril por duas vezes; 2) os biofilmes foram desidratados com álcool

(etanol a 70% durante 10 minutos, etanol a 95% durante 10 minutos e etanol a 100% durante 20 minutos); 3) as placas foram acondicionadas em dessecador em temperatura ambiente. Subsequentemente, as lamínulas foram removidas, coladas nos stubs e os biofilmes foram revestidos com ouro e visualizados no Microscópio Eletrônico de Varredura Quanta 450 FEG (Central Analítica da UFC, Brasil).

3.13 Microscopia Eletrônica Confocal a Laser

Os efeitos de diferentes concentrações dos CBCC sobre os biofilmes também foram analisados utilizando microscopia eletrônica confocal de varredura a laser. Os biofilmes foram preparados como descrito anteriormente diretamente na superfície de lamínulas Thermanox™ (Thermo Fisher Scientific, EUA), utilizando uma placa de cultura de 24 poços. Após a incubação, os biofilmes foram lavados com PBS e, posteriormente, corados com o *kit* de reagentes fluorescentes LIVE/DEAD™ (Invitrogen, EUA). As lamínulas foram avaliadas em Microscópio Confocal Nikon C2, a 488 nm para a detecção do corante SYTO9, que identifica células viáveis (em verde), e a 561nm para a detecção do iodeto de propídio, o qual identifica células não-viáveis.

3.14 Ensaio de viabilidade celular

Após a tripsinização, o número de células ($5 \cdot 10^4/200\mu\text{L}/\text{poço}$) foi ajustado por contagem em câmara de Neubauer. As células foram adicionadas a placas de poliestireno de 96 cavidades de fundo plano, mantido durante 24 horas a 37° padrão condições de cultura numa atmosfera de 95% de humidade e 5% de CO₂. O composto testado foi solubilizado em dimetilsulfóxido (DMSO), resultando em uma solução a uma concentração de 500 µg/mL e 1% de DMSO que foi então diluído em série, gerando oito concentrações de teste, 500;250; 125;62,5; 31,25; 15,6; 7,8 e 3,9 µg/mL. Após 24 horas de adição de células, o meio foi removido da placa de 96 poços e 200µL/poço de meio DMEM contendo o composto CBCC foi adicionado nas concentrações acima. Nos poços de controle, apenas os meios DMEM e DMSO

foram adicionados. A fim de padronizar as condições experimentais, os controles foram montados em paralelo para cada porcentagem de DMSO, uma vez que também estará em diferentes concentrações após a diluição em série. As placas foram preparadas para o teste às 24, 48 e 72 horas. tempo para exposição ao composto, o meio foi removido e substituído por 100 µL de meio DMEM não suplementado, no qual foram adicionados 20 µL de solução salina de tetrazólio MTS (CellTiter 96Aqueous MTS Reagent Powder, Promega, WI, USA) e a densidade foi medida na óptica. um leitor de microplacas multimodal SpectraMax i3 de 490nm de comprimento de onda, de acordo com as especificações do fabricante. Três ensaios independentes e triplicados foram realizados às 24, 48 e 72 horas. A viabilidade celular foi calculada pela seguinte equação:

$$cell\ viability\ (\%) = \frac{\overline{Abs490nm\ (CBCC)}}{\overline{Abs490nm\ (controle)}} \times 100\%$$

3.15 Análises estatísticas

Os dados dos ensaios com microrganismos foram comparados usando a análise de variância unidirecional (ANOVA) com o teste post hoc de Bonferroni. Foi considerado estatisticamente significativo $p < 0,05$.

Para a análise das diferenças entre as porcentagens de viabilidade celular, foi utilizada a análise de variância unidirecional ANOVA seguida do pós-teste de Tukey. Os valores são dados como média \pm SEM.

Os dados foram pré-processados com o software GraphPadPrism v 8.0 para Windows® e considerados estatisticamente significativos quando $p < 0,05$.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Atividade antimicrobiana de CBCC sobre células planctônicas

4.1.1 Concentração inibitória mínima, concentração microbicida mínima e concentração microbicida mínima

A atividade antimicrobiana do extrato sobre o crescimento planctônico dos microrganismos testados foi determinada através dos ensaios de determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM) com resultados entre 15,6 e 62,5 µg/mL, Concentração Microbicida Mínima (CMM)c com resultados entre 125 e 250 µg/mL (Tabela 2). Combinações multiespécie apresentaram CIM de 500 µg/ml em todas as combinações entre bactérias e fungo testados, porém, o extrato não apresentou valores de CMM (Tabela 3).

Tabela 2 - Concentração Inibitória Mínima (CIM) e Concentração Bactericida Mínima (CBM) do extrato frente a *Candida albicans*, *Staphylococcus aureus* e *Pseudomonas aeruginosa*.

MONOESPÉCIE		
	CIM	CMM
<i>Candida albicans</i> ATCC90028	62,5 µg/mL	250 µg/mL
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923	15,6 µg/mL	250 µg/mL
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 700698	15,6 µg/mL	125 µg/mL
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 10145	31,2 µg/mL	250 µg/mL
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 9027	31,2 µg/mL	250 µg/mL

Fonte: Elaborado pela autora.

Tabela 3 - Concentração Inibitória Mínima (CIM) e Concentração Microbicida Mínima (CMM) do extrato.

MULTIESPÉCIE		
	CIM	CMM
<i>S. aureus</i> ATCC25923 + <i>Cândida albicans</i> ATCC 90028	500 µg/mL	-
<i>S. aureus</i> ATCC 700698 + <i>Cândida albicans</i> ATCC 90028	500 µg/mL	-
<i>P. aeruginosa</i> ATCC 10145 + <i>Cândida albicans</i> ATCC 90028	500 µg/mL	-
<i>P. aeruginosa</i> ATCC 9027 + <i>Cândida albicans</i> ATCC 90028	500 µg/mL	-

Fonte: Elaborado pela autora.

C. albicans apresentou a menor suscetibilidade ao extrato dentre os microrganismos testados, com CIM de 62,5 µg/mL, enquanto a concentração mínima inibitória para as cepas de *S. aureus* e *P. aeruginosa* foram, respectivamente 15,6 µg/mL e 31,2 µg/mL.

Extratos aquosos e alcoólicos de casca e folha de *Croton roxburghii* foram testados contra patógenos entéricos monoespécie que causam infecções do trato urinário, o extrato etanólico da casca apresentou atividade inibitória contra uma maior diversidade de cepas em comparação com os extratos aquosos, mas com valores mais altos de CIM de 0,356 a 0,625 mg/mL (PANDA; DUTTA; BASTIA, 2010), concentrações essas muito superiores a utilizadas no presente estudo.

Existem diferenças nas atividades de extratos de diferentes espécies de *Croton*. Díaz *et al.* (2019), em estudos com extratos e frações de *Croton linearis* demonstram a atividade reduzida dessa espécie contra fungos e bactérias, diferentemente do presente estudo que mostra o potencial antimicrobiano do extrato do *Croton blanchetianus* como antimicrobiano e antibiofilme.

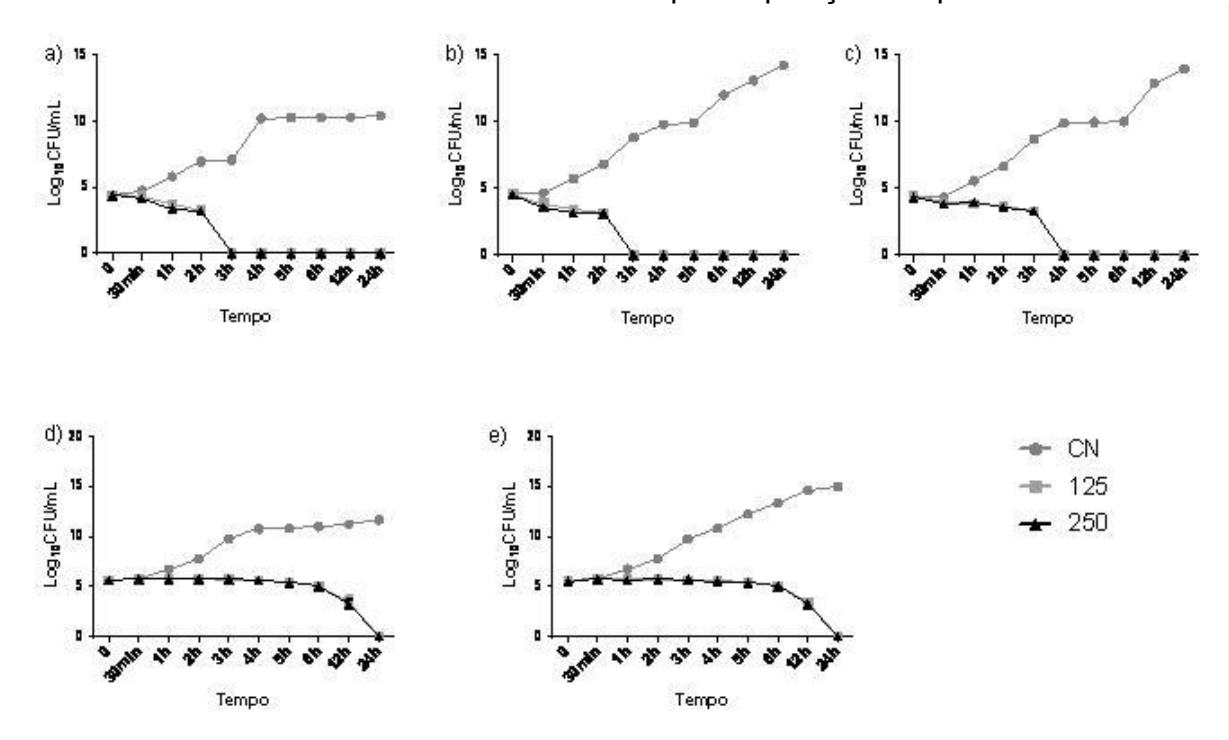
Carneiro *et al.* (2011) demonstrou que um diterpeno casbano isolado de *Croton nepetaefolius* apresentou atividade antimicrobiana sobre células planctônicas de bactérias gram-positivas, inibindo ou reduzindo seu crescimento. O diterpeno casbano frente à *S. aureus*, numa concentração de 125 µg/mL reduziu em cerca de 74% o crescimento planctônico bacteriano, com CIM de 250 µg/mL e CBM de 500 µg/mL, não apresentando CIM nem CBM para bactérias gram-negativas.

4.1.2 Ensaio do tempo de morte microbiana na presença do extrato

Para a determinação da cinética de morte, as concentrações testadas foram 250 µg/mL, que correspondia ao valor da CMM, e 125 µg/mL, correspondente a metade do valor CMM. Em termos gerais, o extrato apresentou ação bactericida e redução do número de UFCs a partir da primeira hora de contato com *S. aureus*, *P. aeruginosa* e *C. albicans* nas concentrações de 125 µg/mL e 250 µg/mL.

O extrato mostrou efetividade bactericida de 100% para as estirpes de *S. aureus*, a partir da 3^ah de exposição (Gráfico 1a e b), para *C. albicans* a partir da 4^ah de exposição (Gráfico 1c) e da 24^ah para as estirpes de *P. aeruginosa* (Gráfico 1c e d).

Gráfico 1 - Cinética de morte microbiana após exposição temporal ao extrato.



Fonte: Elaborado pela autora.

Cinética de morte de (a) *S. aureus* ATCC25923; (b) *S. aureus* ATCC700698; (c) *C. albicans* ATCC90028; (d) *P. aeruginosa* ATCC10145; e (e) *P. aeruginosa* ATCC9027.

Extratos alcoólicos e diterpenos isolados do *Croton sonderianus* já foram descritos com atividade biológica em ensaios antimicrobianos qualitativos preliminares frente à *S. aureus*, *P. aeruginosa*, *C. albicans* e outros (MCCHESENEY; CLARCK; SILVEIRA, 1991).

4.2 Atividade antimicrobiana de CBCC sobre biofilmes antibiofilme

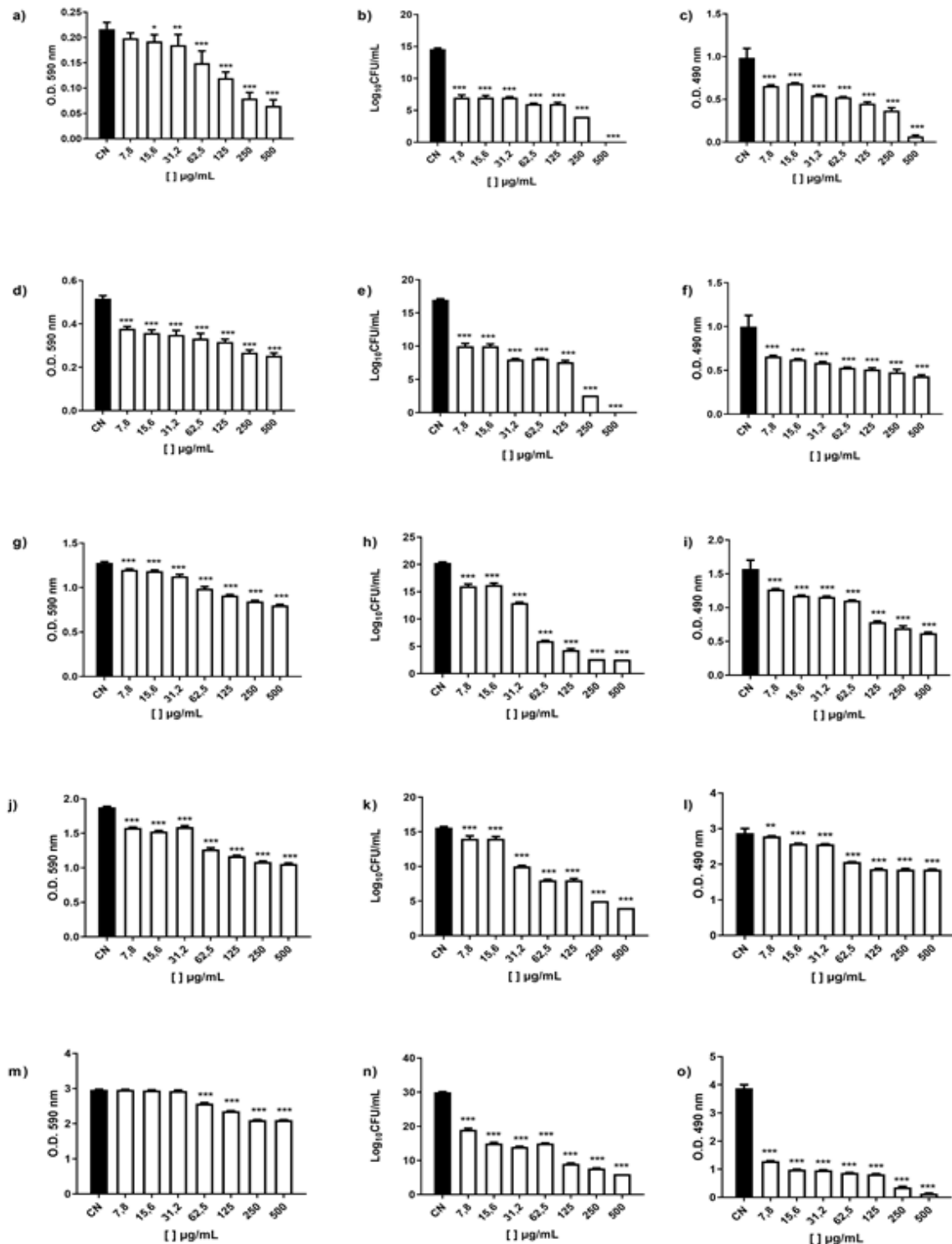
4.2.1 Atividade de CBCC sobre a formação de biofilmes monoespécie

O extrato reduziu a formação da biomassa em todas as concentrações testadas frente todos os microrganismos analisados, com níveis de redução entre 10 e 100%. A cepa *S. aureus* ATCC25923 se mostrou mais sensível ao composto quando comparado com *S. aureus* ATCC700698, que apresentou redução de cerca de 60% de sua biomassa na concentração de 7,8 µg/mL e aproximadamente 100% na concentração de 500 µg/mL (Gráfico 2 a e d). A cepa de *P. aeruginosa* ATCC10145 mostrou-se menos suscetíveis ao contato com o extrato, apesar de ainda gerar inibição na produção de biomassa em todas as concentrações testadas. Quanto à *P. aeruginosa* ATCC9027, a menor concentração testada foi capaz de inibir a produção de biomassa em cerca de 75%. Para *C. albicans*, a concentração de 7,8 µg/mL inibiu a formação de biofilme em 50% (Gráfico 2).

Em relação aos ensaios de atividade metabólica, as cepas de *C. albicans* e *P. aeruginosa* apresentaram maior suscetibilidade ao extrato quando comparadas às cepas de *S. aureus*. Entretanto, ainda nas cepas menos suscetíveis, houve redução de 50% da produção de biomassa na menor concentração testada do composto.

Quanto ao ensaio de enumeração de células viáveis no biofilme houve redução de 50% nas unidades formadoras de colônias na concentração de 7,8 µg/mL reduzindo 7 logs frente às cepas de *S. aureus*. *C. albicans* em todas as concentrações testadas apresentaram redução estatisticamente significativa das UFCs e houve total inibição nas concentrações de 500 µg/mL. Quanto à *P. aeruginosa*, resultados expressivos foram observados na concentração de 250 µg/mL para *P. aeruginosa* ATCC9027 e de 500 µg/mL para *P. aeruginosa* ATCC10145.

Gráfico 2 - Biofilmes monoespécie expostos a diferentes concentrações do extrato.



Fonte: Elaborado pela autora.

C. albicans ATCC 90028(a-c), *S. aureus* ATCC 25923 (d-f), *S. aureus* ATCC 700698 (g-i), *P. aeruginosa* ATCC10145 (j-l), *P. aeruginosa* ATCC9027(m-o). As barras de erro indicam os desvios padrão das médias

*Significativamente diferente (p < 0,05) em comparação ao grupo controle.

Extratos hidroalcoólicos de *Croton urucurana* inibiram a adesão e formação de biofilmes de *C. albicans* segundo estudos de Barbieri (2014) corroborando com os resultados obtidos no gráfico 2.

Sabendo que a presença da membrana externa em bactérias gram-negativas constitui uma barreira para a permeabilidade de moléculas hidrofóbicas. Assim, a interação de moléculas com a membrana celular pode ser limitada e, conseqüentemente, o efeito antibacteriano ser inibido como mostra o estudo de Carneiro *et al.* (2011) que relata que um diterpeno interferiu na formação de biofilmes de *S. aureus*, inibindo seu desenvolvimento em concentrações acima de 125 µg/mL. Em relação as bactérias gram-negativas, o efeito do diterpeno isolado de *C. nepetaefolius* foi diferente, interferindo apenas no desenvolvimento do biofilme e sem afetar o crescimento planctônico.

4.2.2 Atividade de CBCC sobre biofilmes pré-formados monoespécie

Nos ensaios de biofilmes monoespécie pré-formados (Gráfico 3), *P.aeruginosa* ATCC9027 apresentou menor suscetibilidade nos ensaios de biomassa quando comparada à *P. aeruginosa* ATCC10145, onde houve redução estatisticamente significativa em todas as concentrações testadas. Sobre *C. albicans*, a menor concentração com resultado significativo sobre a redução de biomassa foi de 15,6 µg/mL; entretanto, a concentração de 500µg /mL gerou redução de mais de 50% no ensaio.

Quanto aos ensaios de atividade metabólica, todas as cepas foram suscetíveis a todas as concentrações testadas do composto. O mesmo aconteceu na enumeração de células viáveis nos biofilmes pré-formados monoespécies com diminuição mínima de 3logs e em concentrações acima de 250 µg/mL não foram visualizados crescimento celular.

O extrato reduziu a formação de biomassa em todas as concentrações testadas frente todos os microrganismos analisados, com níveis de redução entre 10 e 100%.*S. aureus* ATCC25923 se mostrou mais sensível ao composto quando comparada a *S. aureus* ATCC700698, apresentado redução de cerca de 60% de sua biomassa na concentração de 7,8 µg/mL e aproximadamente de 100% na

concentração de 500 µg/mL. *P. aeruginosa* ATCC10145 mostrou-se menos suscetível ao contato com o composto, apesar de ainda apresentar diminuição na produção de biomassa em todas as concentrações testadas. Quanto à *P. aeruginosa* ATCC9027, a menor concentração testada foi capaz de inibir a produção de biomassa em cerca de 75%. Para *C. albicans*, a concentração de 7,8 µg/mL inibiu a formação de biofilme em 50%.

Estudos utilizando extratos hexânicos e metanólicos de hastes de *Croton pullei* mostraram moderada atividade antibacteriana e antifúngica contra bactérias gram-negativas, bactérias gram-positivas e leveduras responsáveis por várias infecções humanas (PEIXOTO *et al.*, 2013).

Nos ensaios de atividade metabólica, as cepas de *C. albicans* e *P. aeruginosa* apresentaram maior suscetibilidade ao extrato quando comparadas às cepas de *S. aureus*. Entretanto, ainda nas cepas menos suscetíveis, houve redução de 50% da produção de biomassa na menor concentração testada do composto.

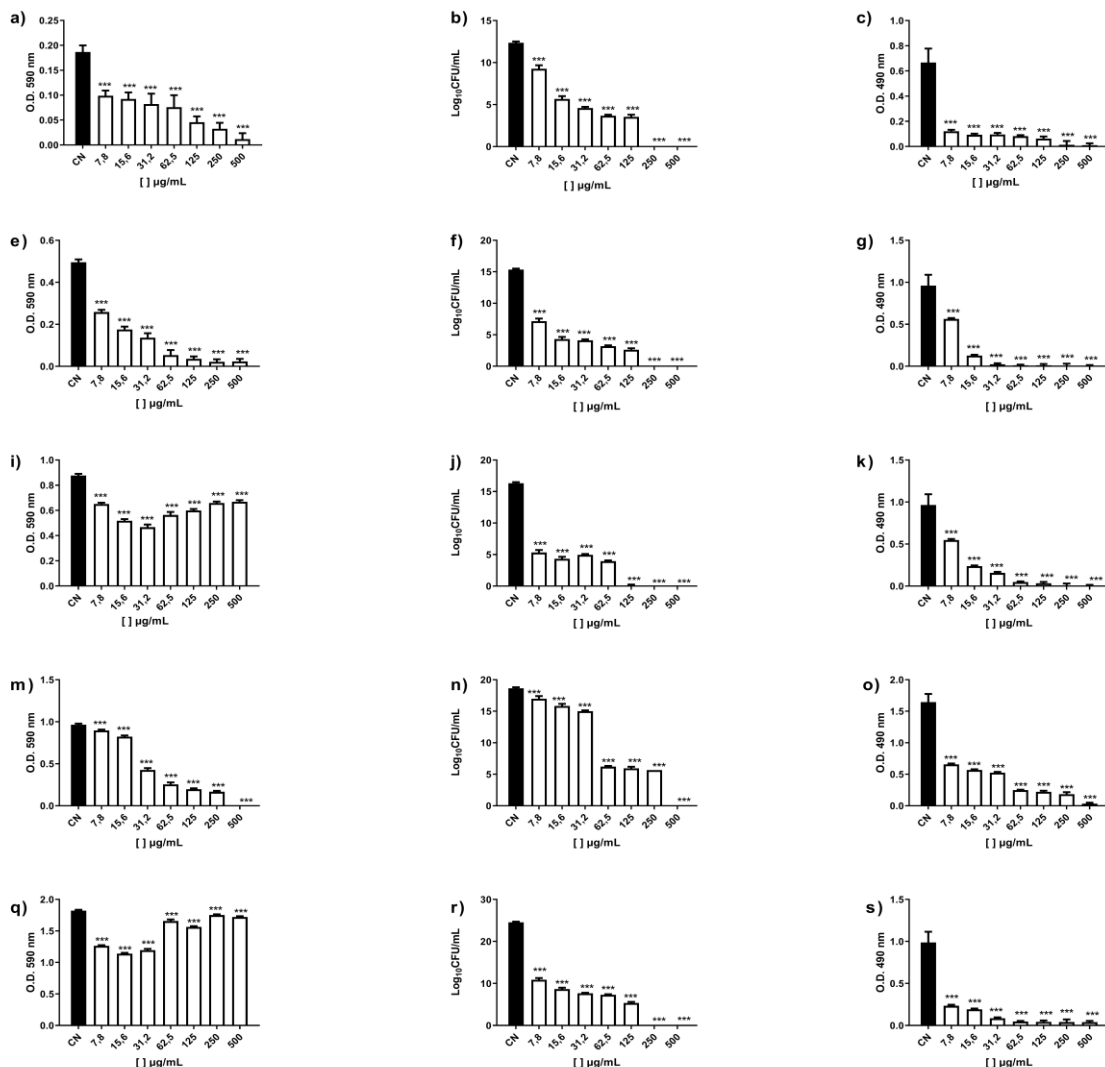
Quanto aos ensaios de enumeração de células viáveis no biofilme houve redução de 50% nas unidades formadoras de colônias na concentração de 7,8 µg/mL quando comparadas às cepas de *S. aureus*. *C. albicans* em todas as concentrações testadas apresentou redução estatisticamente significativa das UFCs e houve total inibição nas concentrações de 250 µg/mL e 500 µg/mL. Quanto à *P. aeruginosa*, resultados expressivos foram visualizados na concentração de 250 µg/mL para *P. aeruginosa* ATCC9027 e de 500 µg/mL para *P. aeruginosa* ATCC10145 (Gráfico 3).

Vários estudos utilizando extratos e frações de diferentes espécies de *Croton* com propriedades antimicrobianas tem sido relatado. Contudo, a maioria dos estudos relatam a utilização de concentrações de extrato acima de 1mg/mL como confirmam Sadgrove, Madeley e Van Wyk (2019) que utilizou diterpenos voláteis de três espécies, *Croton gratissimus*, *Croton pseudopulchellus* e *Croton sylvaticus* que não apresentaram atividade antibacterianas para *S. aureus* e *P. aeruginosa* na concentração de 1mg/mL.

Firmino (2016) demonstrou ação antibiofilme de duas frações diterpenóides, o ICB4 e ICB8 isolados de *Croton blanchetianus* sobre bactérias

Streptococcus spp. e inferiu seu mecanismo de ação à interação da molécula com estruturas da superfície de bactérias gram-positivas. Curiosamente, o extrato analisado no presente estudo apresenta atividade similar sobre *Candida albicans* e efeito antibiofilme estatisticamente significativo sobre microrganismos gram-negativos, o que sugere que a atividade do extrato se deva a presença de um também diterpenóide que é o ácido hardwickiico, componente majoritário.

Gráfico 3 - Biofilmes monoespécie pré-formados expostos a diferentes concentrações de CBCC.



Fonte: Elaborado pela autora.

C. albicans ATCC 90028(a-c), *S. aureus* ATCC 25923 (d-f), *S. aureus* ATCC 700698 (g-i), *P. aeruginosa* ATCC10145 (j-l), *P. aeruginosa* ATCC9027(m-o). As barras de erro indicam os desvios padrão das médias

*Significativamente diferente ($p < 0,05$) em comparação ao grupo controle.

4.2.3 Atividade de CBCC sobre a formação de biofilmes mistos

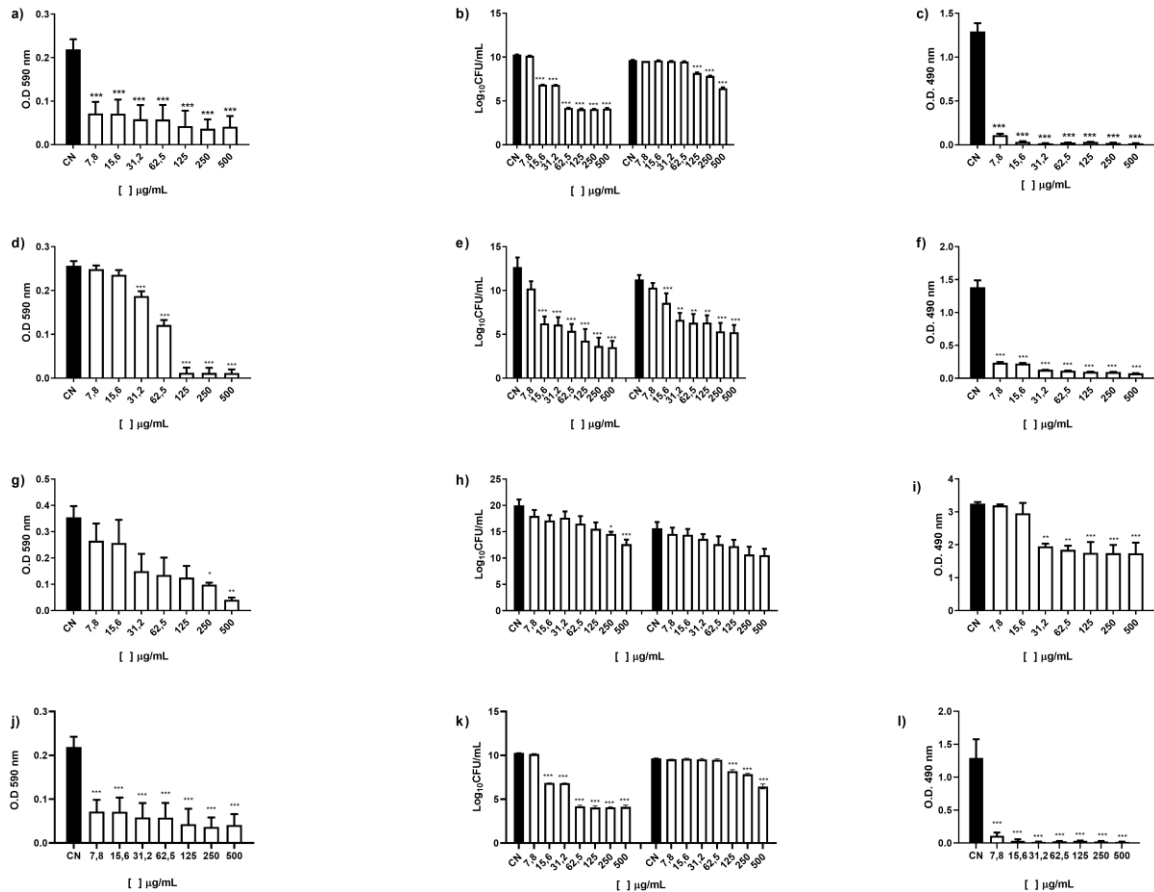
Nos ensaios sobre inibição de formação de biofilmes mistos, houve redução significativa na produção de biomassa e na atividade metabólica em todas as concentrações testadas frente à *S. aureus* ATCC700698 combinada a *C. albicans*. Entretanto, na enumeração de células viáveis observou-se que a redução de células de *S. aureus* ATCC700698 só ocorre a partir da concentração de 15,6 µg/mL e de *C. albicans* a partir de 125 µg/mL (Gráfico 4).

Sobre a combinação de *S. aureus* ATCC25923 com *C. albicans*, todas as concentrações testadas geraram efeito sobre a atividade metabólica das células, mas somente a partir da concentração de 31,2 µg/mL até 500 µg/mL houve redução de biomassa. Na enumeração das células viáveis, houve redução estatisticamente significativa a partir da concentração de 15,6 µg/mL para ambos microrganismos com redução mínima de 2logs

A combinação de *P. aeruginosa* ATCC10145 com *C. albicans*, efeitos sobre o metabolismo celular só foram observados a partir da concentração de 31,2 µg/mL, reduzindo até 5logs. Quanto à quantificação da biomassa, somente as duas maiores concentrações testadas, 250 e 500 µg/mL, apresentaram redução estatisticamente significativa. Na enumeração de células viáveis, somente as duas concentrações citadas acima geraram redução das UFCs de *P. aeruginosa*, não havendo redução de *C. albicans*.

Em relação à combinação de *P. aeruginosa* ATCC9027 com *C. albicans*, houve redução de cerca de 50% da formação de biomassa e de cerca de 90% atividade metabólica em todas as concentrações testadas. Na enumeração de células viáveis, houve redução estatisticamente significativa de *P. aeruginosa* a partir da concentração de 7,8 µg/mL reduzindo até 5logs e de *C. albicans* a partir de 125 µg/mL com redução mínima de 2logs.

Gráfico 4 - Inibição de formação de biofilmes mistos cultivados na presença de diferentes concentrações de CBCC.



Fonte: Elaborado pela autora.

CBM em a, d, g e j, CFU em b, e, h, k e atividade metabólica em c, f, i, l, respectivamente para os biofilmes mistos de *S. aureus* ATCC 25923 e *C. albicans* ATCC90028, *S. aureus* ATCC 700698 e *C. albicans* ATCC90028, *P. aeruginosa* ATCC9027 e *C. albicans* ATCC90028, *P. aeruginosa* ATCC10145 e *C. albicans* ATCC90028. As barras de erro indicam os desvios padrão das médias.

*Significativamente diferente ($p < 0,05$) em comparação ao grupo controle

Neste estudo constatou-se como já descrito na literatura também por Kary-Giann *et al.* (2014) que microrganismos em biofilmes podem apresentar até mil vezes mais resistência a terapias antimicrobianas quando comparados à bactérias planctônicas. Os microrganismos pertencentes a essas comunidades microbianas exibem propriedades únicas, como tolerância a múltiplas drogas e resistência à opsonização e fagocitose do sistema imunológico do hospedeiro, permitindo que eles sobrevivam em ambientes hostis (WEITAO, 2009).

4.2.4 Atividade de CBCC sobre biofilmes pré-formados mistos

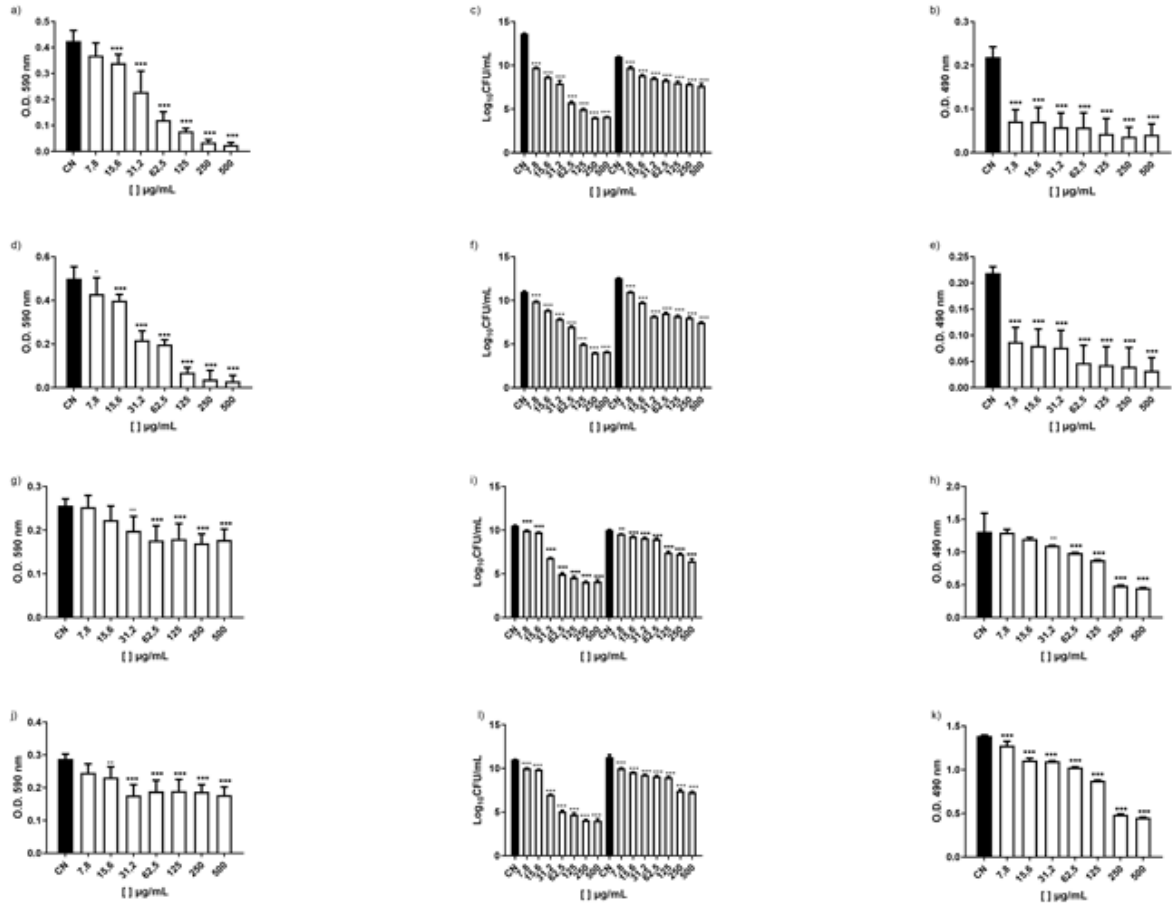
No que diz respeito aos ensaios sobre biofilmes pré-formados mistos, *S. aureus* ATCC700698 em combinação de *C. albicans*, todas as concentrações testadas mostraram redução significativa na produção de biomassa e na atividade metabólica das células. Na enumeração de células viáveis, nota-se que as concentrações de 7,8 a 31,2 µg/mL diminuíram em 3log as UFCs e em 5log nas concentrações de 62,5 a 500 µg/mL para *S. Aureus* geram uma leve diminuição na viabilidade celular de *S. aureus* ATCC700698, enquanto essas mesmas concentrações e as demais são capazes de reduzir as células viáveis de *C. albicans* (Gráfico 5).

Quanto aos biofilmes pré-formados de *S. aureus* ATCC25923 com *C. albicans*, houve redução da atividade metabólica e do número de células viáveis em todas as concentrações testadas e redução da biomassa a partir da concentração de 15,6 µg/mL.

Biofilmes pré-formados de *P. aeruginosa* ATCC9027 com *C. albicans* tiveram redução de biomassa e atividade metabólica a partir da concentração de 31,2 µg/mL, e contagem de UFCs reduzida em todas as concentrações testadas.

Sobre os biofilmes pré-formados de *P. aeruginosa* ATCC10145 com *C. albicans*, houve redução estatisticamente significativa de biomassa e atividade metabólica a partir da concentração 15,6 µg/mL. Na enumeração de UFCs, notou-se que todas as concentrações testadas geraram diminuição das células viáveis de *C. albicans* e de *P. aeruginosa*.

Gráfico 5 - Biofilmes mistos pré-formados expostos a diferentes concentrações do extrato.



Fonte: Elaborado pela autora.

CMM em a, d, g e j, CFU em b, e, h, k e atividade metabólica em c, f, i, l, respectivamente para os biofilmes mistos de *S. aureus* ATCC 25923 e *C. albicans* ATCC90028, *S. aureus* ATCC 700698 e *C. albicans* ATCC90028, *P. aeruginosa* ATCC9027 e *C. albicans* ATCC90028, *P. aeruginosa* ATCC10145 e *C. albicans* ATCC90028. As barras de erro indicam os desvios padrão das médias.

*Significativamente diferente ($p < 0,05$) em comparação ao grupo controle.

Como demonstrado no gráfico 4 e 5 as estipes bacterianas tornam-se mais resistentes na presença de outra estirpe bacteriana ou fungica comprovando a afirmação de Peleg, Hogane e Mylonakis (2010) que atesta que em biofilmes de espécies mistas, contendo bactérias e fungos, é estabelecido as interações entre espécies que podem levar a padrões comportamentais diferentes em ambos os microrganismos, incluindo aumento da resistência aos antimicrobianos, colonização superficial aprimorada e antagonismo entre as espécies.

As análises *in vivo* de biofilmes de espécies mistas são limitadas pelo

fato de que pacientes com infecções polimicrobianas costumam ter outros fatores de risco que se correlacionem com um prognóstico negativo; a ausência de dados sobre o manejo adequado desses microbiomas mistos culmina em terapia inadequada contra um ou ambos os organismos infectantes, aumentando a morbidade causada pela infecção e propulsando a resistência (MORALES; HOGAN, 2010).

Estudos de Vasconcelos *et al.* (2014) demonstraram que *P. aeruginosa* e *S. aureus*, são capazes de formar biofilmes com espécies de *Candida* e que a interação bactéria fungo induz alteração nas células presentes no biofilme corroborando com o presente, afirma também que um diterpeno casbano isolado de *Croton nepetaefolius*, foi capaz de inibir o crescimento planctônico, formação de biofilmes e causar danos nos biofilmes pré-formados de *S.aureus*, *S. epidermidis*, *Candida albicans* e *Candida glabrata*, e mostrou ainda ser efetivo contra biofilmes formados pela associação entre estas bactérias e leveduras. Desse modo, as análises *in vitro* se apresentam como uma possibilidade necessária e urgente de compreensão do consórcio de microrganismos de diferentes espécies

Nowakowska *et al.* (2013) demonstraram em estudo que o ácido 8-hidroxiserrulato-14-en-19-oico, um derivado de diterpenoide serrulatano (extraído da planta medicinal australiana *Eremophilaneglecta*) mostrou atividade inibitória sobre a formação de biofilme na concentração de 100 µg/mL contra bactérias gram-positivas, mas não bactérias gram-negativas, sugerindo que a atividade deu-se por inibição da biossíntese da membrana bacteriana.

4.3 Análise dos biofilmes tratados com CBCC através de microscopias eletrônicas

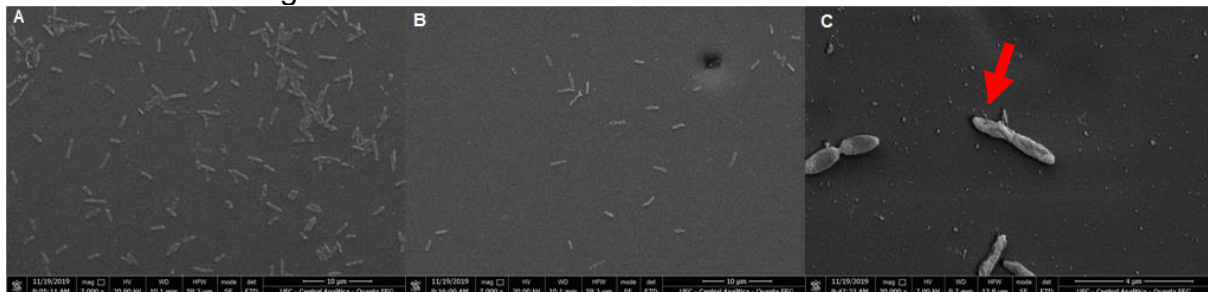
4.3.1 Microscopia eletrônica de varredura (MEV)

Corroborando com os resultados *in vitro* as imagens obtidas por microscopia revelam a diminuição de células e matriz extracelular de biofilme formado por *P. aeruginosa* ATCC9027 exposto a concentração de 125 µg/mL do

extrato (figura 9b) quando comparada ao controle (figura 9a). Na figura 9c pode-se observar a alteração morfológica na estrutura da bactéria.

Considerando as características químicas dos terpenos, sua hidrofobicidade e a interação inespecífica das moléculas dessa classe com os fosfolípidios de membranas bacterianas, pode-se inferir que a atividade antimicrobiana do extrato hidroalcolóico de *C. blanchetianus* rico em ácido hardwickiico, deva-se às interações com os ácidos graxos não-covalentes da bicamada lipídica de bactérias gram-positivas (PRIYADARSHINI *et al.*, 2007), de modo que os ácidos lipoteicoicos da membrana das bactérias gram-positivas facilitariam a entrada de compostos hidrofóbicos (BEZIĆ *et al.*, 2003). Essa hipótese corrobora com os dados evidenciados em microscopia eletrônica de varredura do extrato frente aos microorganismos analisados como indicados por setas vermelhas nas figuras 9c e 10c.

Figura 9 - Microscopia eletrônica de varredura de biofilme monoespécie de *Pseudomonas aeruginosa* ATCC9027.

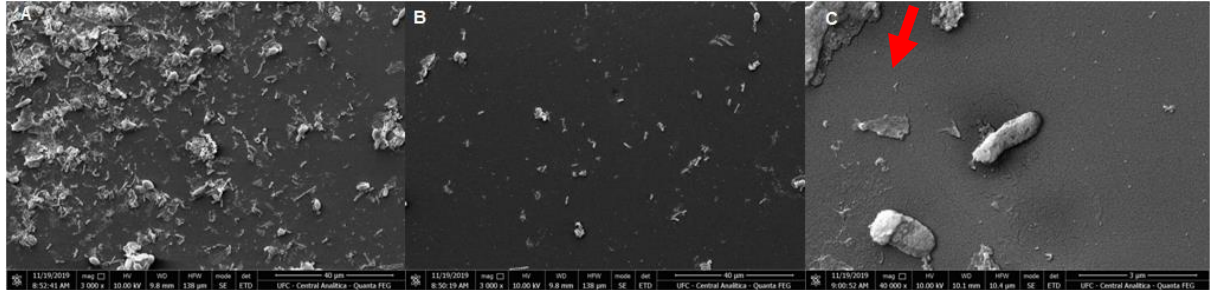


Fonte: Elaborado pela autora.

Controle negativo, mag 7000x (A), CBCC 125µg/mL, mag 7000x (B), CBCC 125µg/mL, mag 30000x (C).

Firmino (2016) demonstrou em experimentos realizados com biofilmes bacterianos tratados com o ICB4, um diterpeno isolado de *C. blanchetianus* que nas duas concentrações relacionadas apresentam espaços vazios que comprovam a influência de ICB4 na formação de biofilmes. Através de análises das eletromicrografias, e dos dados de quantificação da biomassa, constatou-se que houve uma diminuição na quantidade de matriz extracelular polissacarídica. Tal matriz está relacionada com a proteção das células de agressões externas e como barreira à difusão de pequenas moléculas (ANDERSON; O'TOOLE, 2008).

Figura 10 - Microscopia eletrônica de varredura de biofilme misto de *Candida albicans* ATCC90028 e *Pseudomonas aeruginosa* ATCC9027.



Fonte: Elaborado pela autora.

Controle negativo, mag 3000x (A), CBCC 125µg/mL, mag 3000x (B), CBCC 125µg/mL, mag 40000x (C). Setas vermelhas mostram alteração na integridade da parede do microrganismo.

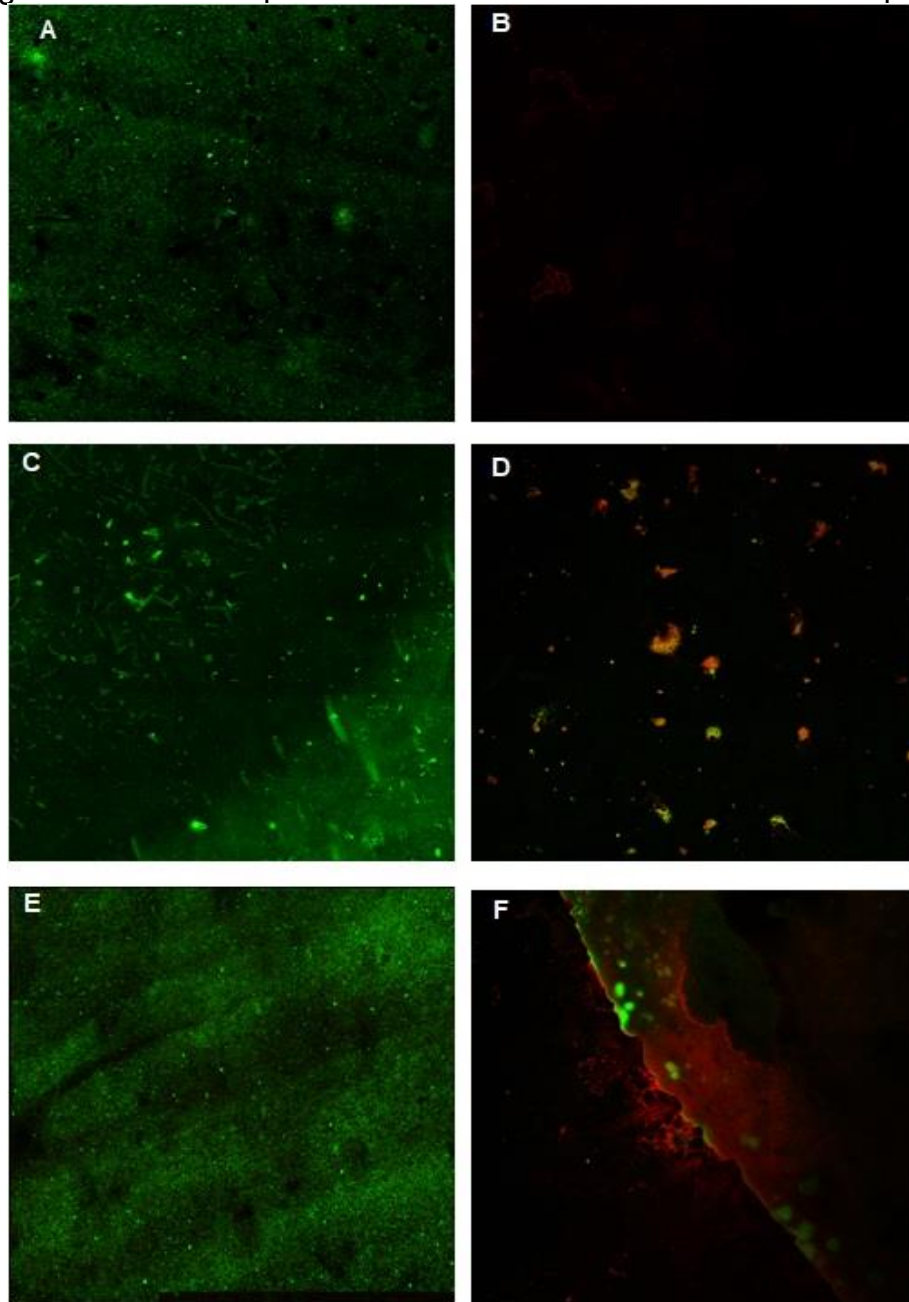
Segundo Firmino (2016), essas alterações são caracterizadas pela formação de poros que levam a lise da célula e a consequente diminuição do número de células viáveis e da quantidade de matriz produzida. Conforme Matsingou *et al.* (2005) a ação antimicrobiana dos diterpenoides deriva do cruzamento ou danos causados na membrana celular.

4.3.2 Microscopia confocal a laser

Biofilmes monoespécie expostos ao CBCC se mostraram suscetíveis na concentração 125 µg/mL apresentando coloração vermelha que demonstra a perda de viabilidade microbiana quando comparadas as imagens do controle negativo em verde em que as espécies foram cultivadas na ausência do extrato (Figura 11).

A microscopia confocal tem sido de grande importância para a compreensão da arquitetura do biofilme em eventos moleculares e morfológicos juntamente com novas técnicas microscópicas de fluorescência podendo ajudar no projeto lógico da superfície de biomateriais com alto poder antimicrobiano (MAEYAMA *et al.*, 2004). Técnicas de microscopia confocal permitem preservar a estrutura tridimensional dos biofilmes, investigando seu arranjo espacial e a matriz com seus diferentes componentes estruturais da podendo supor seu papel na fisiologia e virulência do biofilme, e as propriedades mecânicas e difusivas de diferentes microambientes (SCHLAFER; MEYER, 2017).

Figura 11 - Microscopia eletrônica confocal de biofilmes monoespécie.



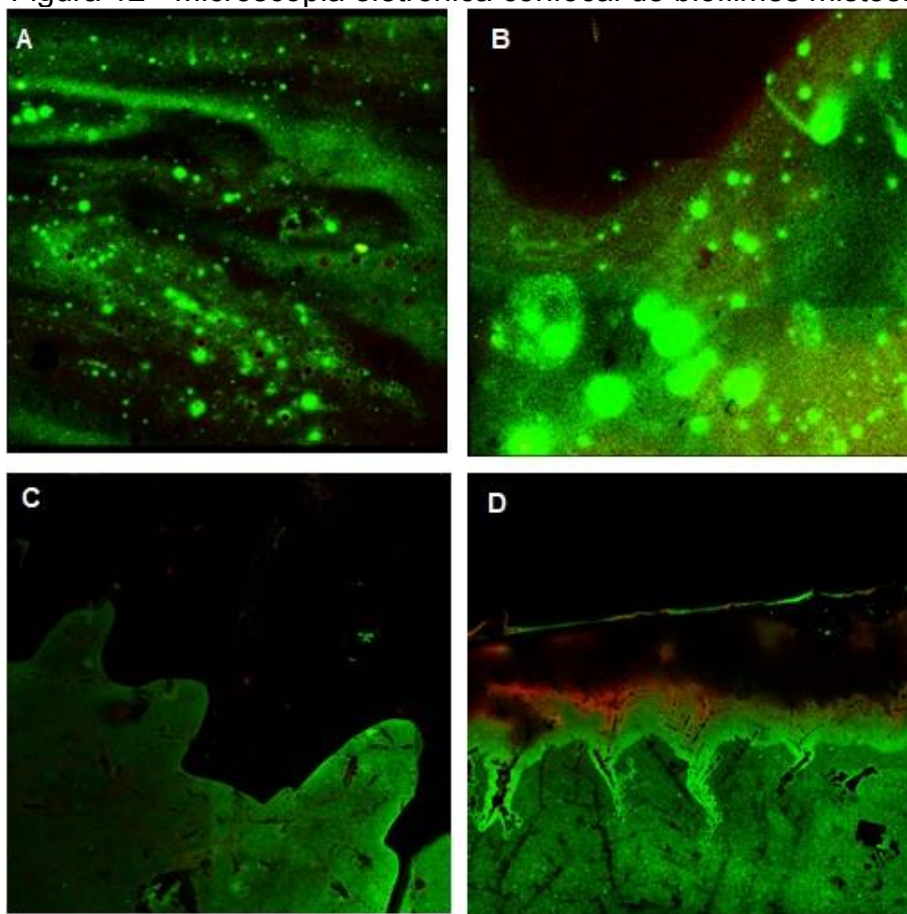
Fonte: Elaborado pela autora.

S.aureus ATCC25923 Controle negativo (A), CBCC 125 µg/mL(B),
P.aeruginosa ATCC9027 Controle negativo (C), CBCC 125 µg/mL(D),
C.albicans ATCC90028 Controle negativo (E), CBCC 125 µg/mL(F). Mag
600x.

Os biofilmes multiespecie apresentaram viabilidade intermediária quando tratados com a concentração de 125 µg/mL, sendo mais intensa em toda superfície

da estrutura, sugerindo que as bactérias presentes na superfície não possuem a mesma resistência das estirpes que estão protegidas por matriz extracelular e outros componentes no centro dos biofilmes. No entanto é possível visualizar no centro do biofilme, ainda que em pouca quantidade, alguns pontos em vermelho que se sugere que os compostos presentes no extrato tenham adentrado pelos canais de água e outras vias atingindo células mais internalizadas (Figura 12).

Figura 12 - Microscopia eletrônica confocal de biofilmes mistos.



Fonte: Elaborado pela autora.

Staphylococcus aureus ATCC25923 e *Candida albicans* ATCC90028 Controle negativo (A), CBCC 125 µg/mL (B), *Pseudomonas aeruginosa* ATCC9027 e *Candida albicans* ATCC90028 Controle negativo (C), CBCC 125 µg/mL (D). Mag 600x.

Consolidando o perfil de coloração obtida nos biofilmes mistos na figura 12, estudos de Werner *et al.* (2004) sugerem um alto nível de atividade metabólica nas células que abrigam a superfície da película de biofilme, metabolismo baixo, lento ou inexistente, nas células que residem no cerne da mesma película como

também a presença de matriz extracelular e dos diferentes padrões de expressão gênica, o que configura uma das explicações para a reduzida suscetibilidade dos microrganismos envolvidos em biofilmes aos antimicrobianos.

4.4 Viabilidade celular e toxicidade de CBCC

O teste de viabilidade celular foi realizado com intuito de determinar o potencial citotóxico do composto CBCC em diferentes concentrações (500-3,9 $\mu\text{g/mL}$) frente às linhagens L929 e HaCat. Baseado em ensaios de padronização, verificou-se que até 1% é a dose de DMSO em que a viabilidade celular fica acima de 70% em todos os três tempos testados para ambas as linhagens. Para L929 o extrato apresentou maior toxicidade em função do aumento da concentração, o que foi mais bem observado para concentrações acima de 62,5 $\mu\text{g/mL}$ (Gráfico 6). Nos tempos de 24, 48 e 72h a viabilidade para a maior concentração testada ficou em $37,2 \pm 1,6\%$; $27,8 \pm 2,15\%$ e $23,7 \pm 2,8\%$, respectivamente. Foi observado que nos três tempos as concentrações abaixo de 31,5 $\mu\text{g/mL}$ a viabilidade ficou acima de $93,6 \pm 3,1\%$. A determinação da IC50 estabeleceu três diferentes concentrações capazes de inibir 50% do crescimento celular, 149,5; 207,8 e 229,6 $\mu\text{g/mL}$, para os três tempos testados 24, 48 e 72h, respectivamente.

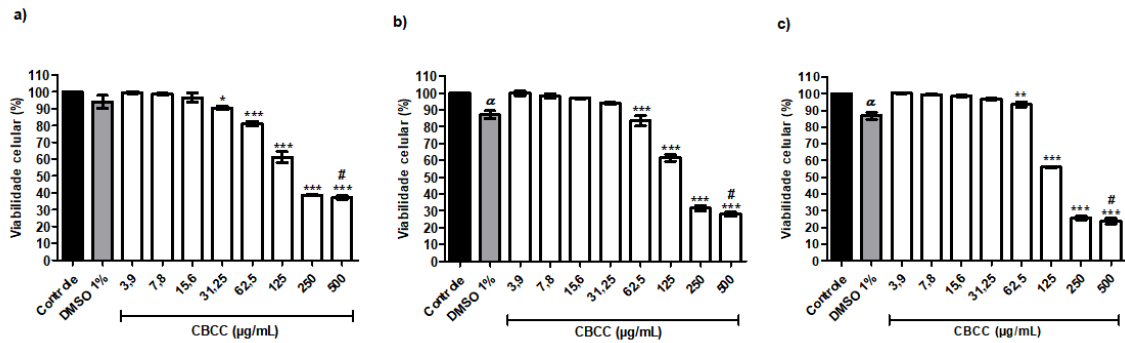
As fotomicrografias de L929 (Figura 13) mostram as células que foram expostas às concentrações de 500-1% (Figura 13A); 62,5-0,12% (Figura 13B) e 3,9 $\mu\text{g/mL}$ -0,007% DMSO (Figura 13C). À direita estão os controles expostos às diferentes concentrações de DMSO, 1% (Fig. 13D); 0,12% (Figura 13E) e 0,007% (Figura 13F) apenas. O tempo analisado foi 72h. Na figura 13A houve uma redução no número de células sendo possível observar alterações morfológicas quando comparado ao controle 1% DMSO. Houve redução das dimensões celulares, porém não foi observado perda da adesão celular. Na figura 13B notou-se um aumento do número de células com morfologia semelhante ao controle, algumas células encontram-se com o tamanho reduzido o que pode estar associado a alta densidade celular, assim como observado na Figura 13C.

Para a linhagem HaCat o composto apresentou toxicidade bem menor quando comparado à linhagem L929 (Gráfico 6). Uma leve redução na viabilidade celular foi observada somente após 48h de incubação, que ainda assim permaneceu acima de $80,6 \pm 5,4\%$ para a maior concentração de $500 \mu\text{g/mL}$ –1%, o que se manteve após 72h. Outro fator curioso foi que a porcentagem de viabilidade do DMSO 1% foi de $85,4 \pm 8,7\%$ em todos os três tempos analisados, enquanto que para $500 \mu\text{g/mL}$ –1% foi de $86,6 \pm 9,2\%$ nos mesmos tempos observados, levando a acreditar que a leve redução na viabilidade de HaCat esteja relacionado ao DMSO e não ao CBCC.

Estudos de Silva *et al.* (2018) mostrou a toxicidade do extrato metanólico de folhas de *Croton heliotropiifolius* Kunth que foi testada frente à *Artemia* salina no bioensaio realizado nas concentrações de $50 \mu\text{g/ml}$, $100 \mu\text{g/ml}$, $250 \mu\text{g/ml}$, $500 \mu\text{g/ml}$, $750 \mu\text{g/ml}$, $1000 \mu\text{g/ml}$ de extrato metanólico de folhas apresentando uma moderada toxicidade para a *Artemia* salina, com valores de CL 50 na faixa de $637,29 \mu\text{g/mL}$. Neste estudo não houve IC50 para as concentrações testadas nos tempos analisados, tendo em vista que a viabilidade ficou sempre acima de 75% para todas as concentrações e tempos em estudo.

As fotomicrografias de HaCat (Figura 14) revelam uma morfologia celular inalterado, com arquitetura das colônias preservadas, baseado no padrão de crescimento em focos comumente observado para esta linhagem. O tempo analisado foi de 72h. A densidade celular para $3,9 \mu\text{g/mL}$ –0,007% DMSO (Figura 14C) mostra-se semelhante à encontrada no controle de 0,007% (Figura 14F), tal achado corrobora com o que foi observado no ensaio de viabilidade celular.

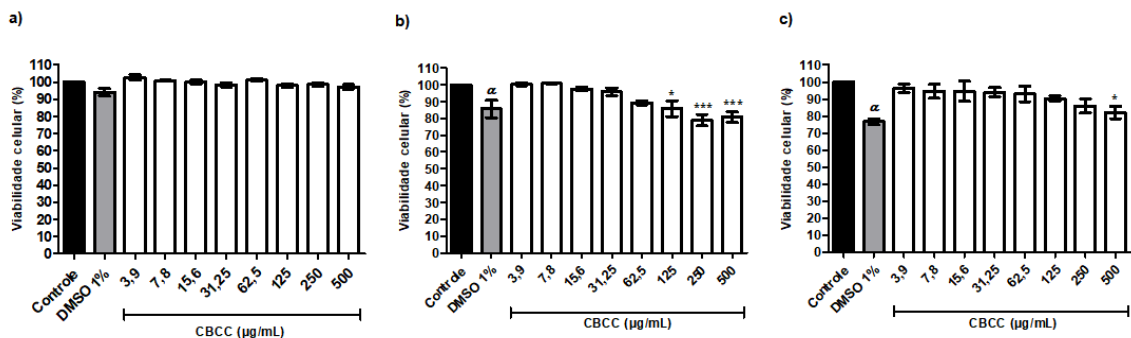
Gráfico 6 - Efeito de CBCC sobre a viabilidade celular de L929.



Fonte: Elaborado pela autora.

As células foram tratadas com diferentes concentrações (500-3,9 µg/mL) de CBCC. A viabilidade celular (%) foi medida por ensaio MTS. a) Efeito de CBCC sobre a viabilidade celular por 24 horas. b) Efeito de CBCC sobre a viabilidade celular por 48 horas. c) Efeito de CBCC sobre a viabilidade celular por 72 horas. (n = 3, média ± SEM). (*; **, *** P < 0.05 quando comparado ao controle ao controle).

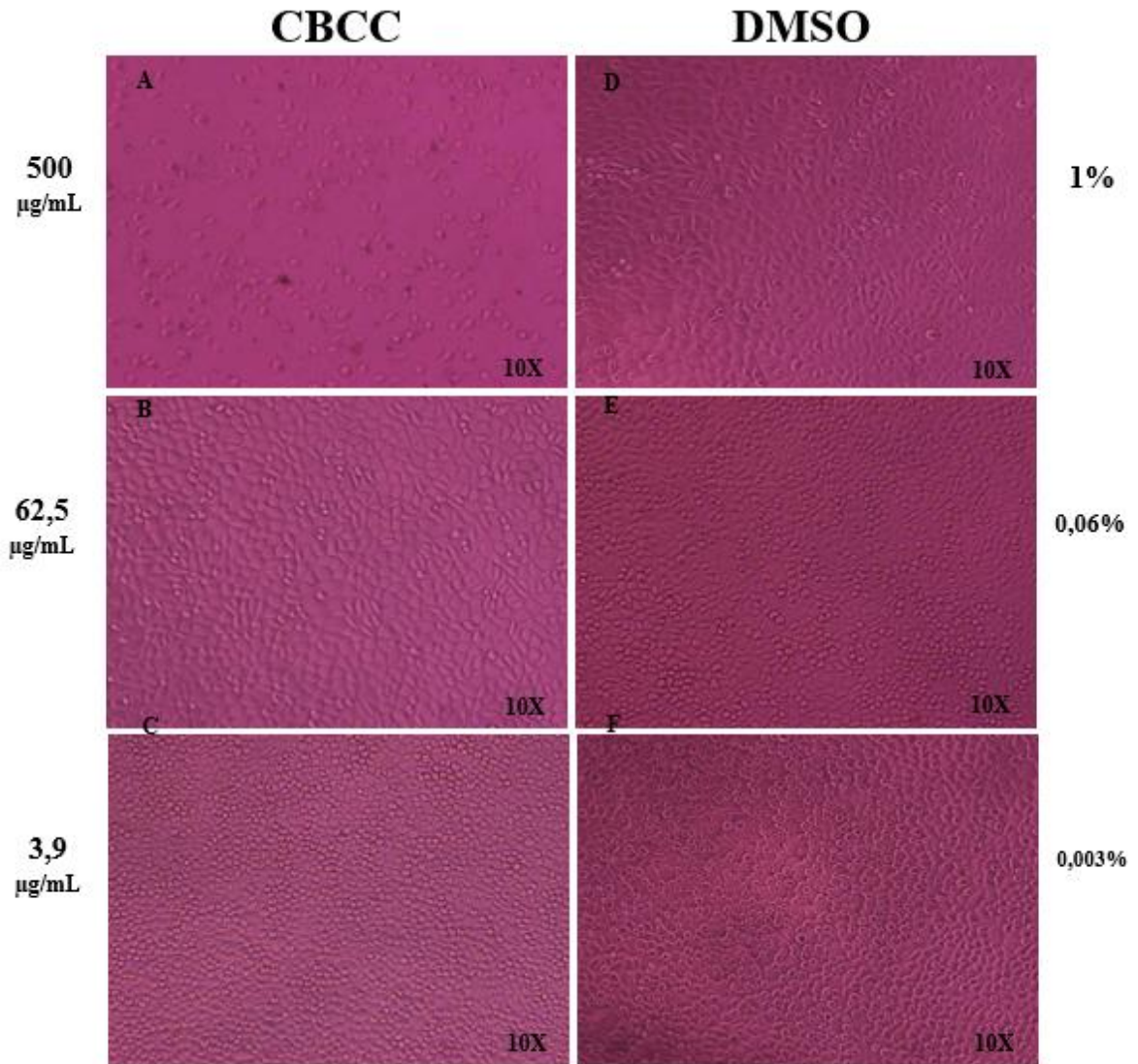
Gráfico 7 - Efeito de CBCC sobre a viabilidade celular de HaCat.



Fonte: Elaborado pela autora.

As células foram tratadas com diferentes concentrações (500-3,9 µg/mL) de CBCC. A viabilidade celular (%) foi medida por ensaio MTS. a) Efeito de CBCC sobre a viabilidade celular por 24 horas. b) Efeito de CBCC sobre a viabilidade celular por 48 horas. c) Efeito de CBCC sobre a viabilidade celular por 72 horas. (n = 3, média ± SEM). (*; **, *** P < 0.05 quando comparado ao controle ao controle).

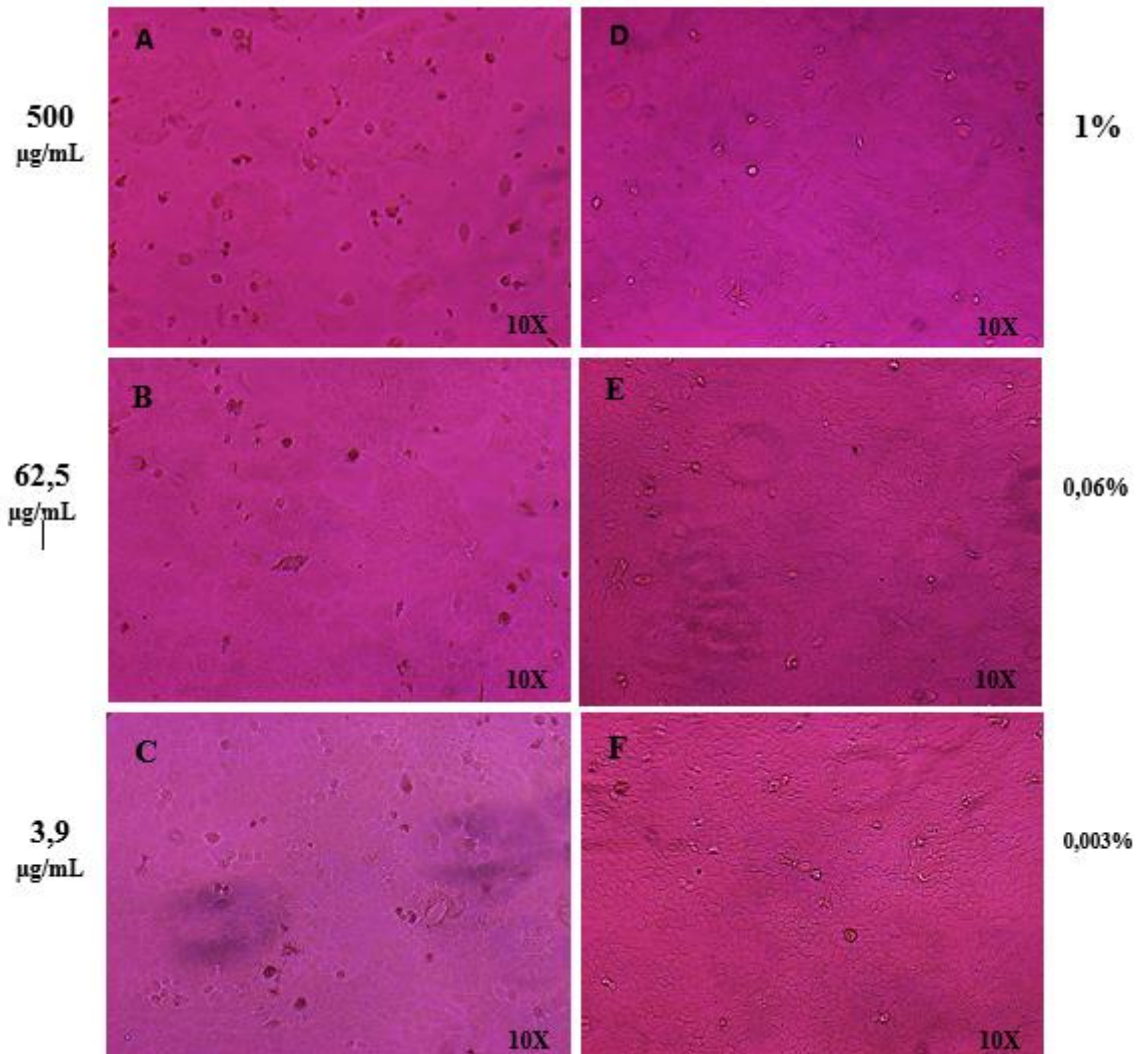
Figura 13 - Fotomicrografia da linhagem L929 tratada com CBCC após 72 horas.



Fonte: Elaborada pela autora.

A-C tratadas com CBCC nas concentrações de 500; 62,5 e 3,9 µg/mL respectivamente. D-F controles pareados com DMSO em diferentes concentrações, 1%; 0,06% e 0,006% respectivamente, referentes às concentrações do composto. Aumento 10x.

Figura 14 - Fotomicrografia da linhagem HaCat tratada com CBCC após 72 horas.



Fonte: Elaborada pela autora.

A-C tratadas com CBCC nas concentrações de 500; 62,5 e 3,9 µg/mL respectivamente. D-F controles pareados com DMSO em diferentes concentrações, 1%; 0,06% e 0,006% respectivamente, referentes às concentrações do composto. Aumento 10x.

Ao prospectar novas moléculas com potencial antimicrobiano, também se deve buscar compostos com uma baixa toxicidade para células de mamíferos com intuito de otimizar as fases da medicina translacional. Diante disso, realizou-se o ensaio de viabilidade celular para as linhagens de fibroblasto murino (L929) e queratinócitos humanos (HaCat). A linhagem L929 foi selecionada para o ensaio de toxicidade por ser comumente utilizada nas avaliações de citotoxicidade *in vitro* (COCHRANE *et al.*, 2003).

Os fibroblastos mostraram-se mais sensíveis ao CBCC quando comparado aos queratinócitos, demonstrando uma toxicidade seletiva de CBCC. Até na maior dose de 500 µg/mL a porcentagem de viabilidade para HaCat foi de $86,6 \pm 9,2\%$ nos tempos de 24, 48 e 72h, para L929 uma porcentagem semelhante só foi observada em doses abaixo de 62,5 µg/mL. Carvalho (2016) ao analisar a toxicidade das frações ácidas e básicas extraídas do extrato bruto de folhas e raízes de *Croton blanchetianus* frente a linhagem de fibroblasto pulmonar humano (MRC5), verificou que as frações apresentaram baixa toxicidade quando utilizadas até a concentração de 200µg/mL nos tempos de 24 e 48h. O que reforça a baixa toxicidade de CBCC frente à linhagem humana HaCat, tendo em vista que mesmo utilizando 500 µg/mL por 72h a viabilidade celular mantém-se acima de 75%.

As concentrações de IC50 para L929 foram crescentes em função do aumento do tempo de exposição ao CBCC, apesar da sensível redução da viabilidade celular nas concentrações acima de 250 µg/mL, o que configura a necessidade de uma concentração maior de CBCC para que seja capaz de reduzir a população de fibroblastos em 50%. Tal evento pode ser justificado pelo sensível aumento do número de fibroblastos ao longo do tempo decorrente da proliferação celular normal, porém tais células podem apresentar-se com atividade mitocondrial alterada o que se traduziria na redução da transformação do MTS em formazan o que é interpretado como redução da viabilidade celular. Para HaCat não foi possível calcular a IC50, pois o composto apresentou baixa toxicidade e até na maior concentração após 72h a viabilidade celular ficou em 75%.

A citotoxicidade de um composto pode ser identificada na análise morfológica através da desorganização da monocamada de células, destacamento das células do fundo do poço, bem como o aspecto granuloso do citoplasma, arredondamento e redução das dimensões celulares. Tais sinais foram mais frequentes na linhagem L929 na concentração de 500µg/mL, porém não foi observado o destacamento celular até mesmo na maior concentração. Para HaCat houve uma leve redução da densidade celular quando comparado aos controles. As fotomicrografias das linhagens HaCat e L929 confirmam os achados do ensaio de MTS.

5 CONCLUSÃO

Os resultados apresentados nesse trabalho mostram a atividade antimicrobiana do extrato hidroalcolico do caule do *C. blanchetianus* rico ácido hardwikiico (CBCC), componente majoritário, sobre bactérias e *Candida* em suas formas planctônicas, biofilmes monoespécie e biofilmes multiespécie. Além disso, extrato não apresentou citotoxicidade quando testado em fibroblastos murino e queratinócitos humano.

Assim, é possível sugerir que o extrato do caule de *Croton blanchetianus* rico em CBCC é uma potencial e promissora substância que poderá ser utilizada na bioprospecção de novos compostos antimicrobianos contra infecções causadas por biofilmes mono e polimicrobianos formados por *S.aureus*, *P.aeruginosa* e *C.albicans*.

REFERÊNCIAS

ABEE, Tjakko *et al.* Biofilm formation and dispersal in Gram-positive bacteria. **Current Opinion in Biotechnology**, [s. l.], v. 22, n. 2, p. 172-179, nov. 2010.

AGENCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. **Programa nacional de prevenção e controle de infecções relacionadas à assistência à saúde (2016-2020)**. Brasília: ANVISA, 2016. Disponível em: <https://www.gov.br/anvisa/pt-br/centraisdeconteudo/publicacoes/servicosdesaude/publicacoes/pnpciras-2016-2020.pdf>. Acesso em: 25 dez. 2019.

AGUILAR-GUADARRAMA, A. Berenice; RIOS, Maria Yolanda. Three New Sesquiterpenes from Croton arboreous. **Journal of Natural Products**, [s. l.], v. 67, n. 5, p. 743-926, 2004.

ANDERSON, G. G.; O'TOOLE, George. A. Innate and induced resistance mechanisms of bacterial biofilms. **Current Topics in Microbiology and Immunology**, [s. l.], v. 322, p. 85-105, 2008.

BALASUBRAMANIAN, Deepak *et al.* The regulatory repertoire of *Pseudomonas aeruginosa* AmpC β -lactamase regulator AmpR includes virulence genes. **PLoS ONE**, [s. l.], v. 7, n. 3, p. e34067, mar. 2012.

BARLTROP, John A. *et al.* 5-(3-carboxymethoxyphenyl)-2-(4,5-dimethylthiazolyl)-3-(4-sulfophenyl) tetrazolium, inner salt (MTS) and related analogs of 3-(4,5-dimethylthiazolyl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) reducing to purple water-soluble formazans as cell-viability indicators. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, [s. l.], v. 1, n. 11, p. 611-614, 1991.

BECK-SAGUE, Consuelo; JARVIS, William R. Secular trends in the epidemiology of nosocomial fungal infections in the United States, 1980–1990. National nosocomial infections surveillance system. **The Journal of Infectious Diseases**, [s. l.], v. 167, n. 5, p. 1247-1251, 1993.

BEITELSHEES, Marie *et al.* Phenotypic Variation during Biofilm Formation: implications for Anti-Biofilm therapeutic design. **Materials**, [s. l.], v. 11, n. 7, p. 1086, 2018.

BERNARD, Clement, GIRARDOT, Marion; IMBERT, Christine. *Candida albicans* interaction with Gram-positive bacteria within interkingdom biofilms. **Journal de Mycologie Médicale**, [s. l.], v. 30, n. 1, p. 100909, 2019.

BRAND, Alexandra *et al.* Cell wall glycans and soluble factors determine the interactios between the hyphae of *Candida albicans* as *Pseudomonas aeruginosa*. **FEMS Microbiology Letters**, [s. l.], v. 287, n. 1, p.48-55, 2008.

BROWN, Gordon D. *et al.* Hidden killers: human fungal infections. **Science Translational Medicine**, [s. l.], v. 4, n. 165rv13, 2012.

CAIXETA, Danila Soares. **Sanificantes químicos no controle de biofilmes formados por duas espécies de Pseudomonas em superfície de aço inoxidável**. 2008. 75 f. Dissertação (Mestrado em Microbiologia Agrícola) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2008.

CALIXTO, João B. Biodiversidade como fonte de medicamentos. **Ciência e Cultura**, São Paulo, v. 55, n. 3, p. 37-39, 2003.

CAMPOS, Adriana Rolim *et al.* Investigations on the antinociceptive activity of crude extracts from Croton cajucara leaves in mice. **Fitoterapia**, [s. l.], v. 73, n. 2002, p. 116-120, 2002.

CAMPOS, Mônica C. O. *et al.* Croton cajucara crude extract and isolated terpenes: activity on Trypanosoma cruzi. **Parasitology Research**, [s. l.], v. 107, p. 1193-1204, 2010.

CAO, Yuxue *et al.* Non-antibiotic antimicrobial agents to combat biofilm-forming bacteria. **Journal of Global Antimicrobial Resistance**, [s. l.], v. 19, p. 445-451, 2019.

CARMELI, Yehuda *et al.* Emergence of antibiotic-resistant Pseudomonas aeruginosa: comparison of risks associated with different antipseudomonal agents. **Antimicrobial Agents and Chemother**, [s. l.], v. 43, n. 6, p. 1379-1382, 1999.

CARVALHO, Kleyton Thiago Costa de. **Avaliação da atividade citotóxica e pró-apoptótica de Croton blanchetianus baillem linhagens de câncer cervical humano**. 2016. 107 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) - Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Natal, 2016.

CAUMO, Karin *et al.* Resistência bacteriana no meio ambiente e implicações na clínica hospitalar. **Revista Liberato**, Novo Hamburgo, v. 11, n. 16, p. 89-188, 2010.

COCHRANE, Christine A. *et al.* The application of a fibroblast gel contraction model to assess the cytotoxicity of topical antimicrobial agents. **Wounds**, [s. l.], v. 15, n. 8, p. 265-271, 2003.

DÍAZ, Jesús García *et al.* Antimicrobial activity of leaf extracts and isolated constituents of Croton linearis. **Journal of Ethnopharmacology**, [s. l.], v. 236, p. 250-257, 2019.

DUARTE, Mariana Wanderley *et al.* **Atividade antimicrobiana e produção e enzimas extracelulares por actinomicetos isolados de solo**. 2009. 33 f. Trabalho de Conclusão de Curso (Bacharelado em Ciências Biológicas) – Curso de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2009.

EL-AZIZI, Mohamed; STARKS, S. E.; KHARDOR, N. Interactions of *Candida albicans* with other *Candida* spp. and bacteria in the biofilms. **Journal of Applied Microbiology**, [s. l.], v. 96, n. 5, p. 1067-1073, 2004.

ELLIOTT, Camille; JUSTIZ-VAILLANT, Angel. Nosocomial infections: a 360-degree review. **International Biological and Biomedica Journal**, [s. l.], v. 4, n. 2, p. 72-81, 2018. Disponível em: <http://ibbj.org/article-1-178-en.html> Acesso em: 25 dez. 2019.

FIRMINO, Nairley Cardoso Sá. **Potencial biotecnológico de extratos, frações e diterpenos isolados de *Croton blanchetianus* Baill.** Sobre biofilmes orais. 2016. 121 f. Tese (Doutorado em Biotecnologia) – Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2016.

FLEMMING, Hans-Curt; NEU, Thomas R.; WINGENDER, Jost. What are bacterial extracellular polymeric substances? *In*: FLEMMING, Hans-Curt; NEU, Thomas R.; WINGENDER, J. (Eds.). *Microbial extracellular polymeric substances: characterization, structure and function*. Berlin: Springer, 1999. p. 1-19.

FRANCO, Edelita Águida Porfírio; BARROS, Roseli Farias de Melo. Uso e diversidade de plantas medicinais no Quilombo Olho D'água dos Pires, Esperantina, Piauí. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, Paulínia, v. 8, p. 78-88, 2006.

GOMES, Ana Paula de S. **Revisão das espécies sulamericanas de *Croton* L. subgen. *Croton* sect. *Argyroglossum* Baill. (*Crotonoideae*- *Euphorbiaceae*).** 2006. 140 f. Tese (Doutorado em Botânica) – Universidade Federal Rural de Pernambuco, Recife, 2006.

GRYNBERG, Noema F. *et al.* Anti-tumor activity of two 19-nor-clerodane diterpenos, trans-dehydrocrotonin and trans-crotonin, from *Croton cajucara*. **Planta Medica**, [s. l.], v. 65, n. 8, p. 687-689, 1999.

GUIMARÃES, Denise Oliveira; MOMESSO, Luciano da Silva; PUPO, Mônica Tallarico. Antibióticos: importância terapêutica e perspectivas para a descoberta de novos agentes. **Química Nova**, [s. l.], v. 33, n. 3, p. 667-679, 2010.

HARRIOTT, Melpine M; NOVERR, Mairi C. *Candida albicans* and *Staphylococcus aureus* form polymicrobial biofilms: effects on antimicrobial resistance. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, [s. l.], v. 53, n. 9, p.3914–3922, 2009.

HERRMANN, Mathias *et al.* Fibronectin, fibrinogen, and laminin act as mediators of adherence of clinical staphylococcal isolates to foreign material. **The Journal of Infectious Diseases**, [s. l.], v. 158, n. 4, p. 693–701, 1988.

HOGAN, Deborah A.; KOLTER, Roberto. *Pseudomonas-Candida* interactions: na ecological role for virulence factors. **Science**, [s. l.], v. 296, n. 5576, p. 2229-2232, 2002.

INSTITUTO LATINO AMERICANO DE SEPSE. **O que é sepse?** [S. l.], 2019. Disponível em: <https://ilas.org.br/o-que-e-sepse.php>. Acesso em: 18 jan. 2019.

JAMAL, Musin *et al.* Bacterial biofilm and associated infections. **Journal of the Chinese Medical Association**, [s. l.], v. 81, n.1, p. 7-11, 2017.

JOHNSON, Chad J. *et al.* The extracellular matrix of *Candida albicans* biofilms impairs formation of neutrophil extracellular traps. **PLoS Pathogens**, [s. l.], v. 12, n. 9, p. e1005884, 2016.

KALIA, Vipin Chandra; PUROHIT, Hemant J. Quenching the quorum sensing system: potential antibacterial drug targets. **Critical Reviews in Microbiology**, [s. l.], v. 37, n. 2, p. 121-149, 2011.

KATRAGKOU, Aspasia *et al.* Interactions between human phagocytes and *Candida albicans* biofilms alone and in combination with antifungal agents. **The Journal of Infectious Diseases**, [s. l.], v. 201, n. 12, p. 1941-1949, 2010.

KERNIEN, John F. *et al.* The interface between fungal biofilms and innate immunity. **Frontiers Immunology**, [s. l.], v. 8, p. 1968, 2017.

KHAN, Hassan Ahmed; AHMAD, Aftab; MEHBOOB, Riffat. Nosocomial infections and their control strategies. **Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine**, [s. l.], v. 5, n. 7, p. 509-514, 2015.

KLOTZ, Stephen A. *et al.* Polymicrobial bloodstream infections involving *Candida* species: analysis of patients and review of the literature. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**, [s. l.], v. 59, n. 4, p. 401-406, 2007.

LINDSAY, Allia K.; HOGAN, Deborah A. *Candida albicans*: molecular interactions with *Pseudomonas aeruginosa* and *Staphylococcus aureus*. **Fungal Biology Reviews**, [s. l.], v. 28, n. 4, p. 85–96, 2014.

LOWY, Franklin D. *Staphylococcus aureus* infections. **New England Journal of Medicine**, [s. l.], v. 339, n. 8, p. 520-532, 1998.

MACIEL, Maria Aparecida M *et al.* Terpenoids from *Croton cajucara*. **Phytochemistry**, [s. l.], v. 49, n. 3, p. 823-828, 1998.

MAEYAMA, Ryo *et al.* Confocal imaging of biofilm formation process using fluoroprobed *Escherichia coli* and fluoro-stained exopolysaccharide. **Journal of Biomedical Materials Research**, [s. l.], v. 70, n. 2, p. 274-282, 2004.

MATOS, Francisco José de Abreu. **Plantas da medicina popular do Nordeste: propriedades atribuídas e confirmadas**. Fortaleza: Editora da UFC, 1999.

MCCHESENEY, James D.; CLARK, Alice M.; SILVEIRA, Edilberto R. Antimicrobial diterpenes of *Croton sonderianus*, 1. Hardwickiic and 3, 4-secotrachylobanoic acids. **Journal of Natural Products**, [s. l.], v. 54, n. 6, p. 1625-1633, 1991.

MENOITA, Elsa *et al.* Biofilmes: conhecer a entidade. **Journal of aging and innovation**, [s. l.], v.1, n. 3, p. 23-32, abr. 2012.

MITCHELL, Kaitlin F.; ZARNOWSKI, Robert; ANDES, David R. The extracellular matrix of fungal biofilms. **Advances in Experimental Medicine and Biology**, [s. l.], v. 931, p. 21-35, 2016.

MURILLO, Renato M. *et al.* Diterpenes and other constituents from *Croton draco* (Euphorbiaceae). **Revista de Biologia Tropical**, [s. l.], v. 49, n. 1, p. 259-264, 2001.

NGAMROJNAVANICH, Nathaya *et al.* Inhibition of Na⁺, K⁺-ATPase activity by (-)-ent-Kaur-16-en-19-oic acid and its derivatives. **Planta Medica**, [s. l.], v. 69, n. 6, p. 555, 2003.

NOWAKOWSKA, Justyna *et al.* Antimicrobial properties of 8-hydroxyserrulat-14-en-19-oic acid for treatment of implant-associated infections. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, [s. l.], v. 57, n. 1, p. 333-342, 2013.

OLIVEIRA, Adriana Cristina de; SILVA, Rafael Souza da. Desafios do cuidar em saúde frente à resistência bacteriana: uma revisão. **Revista Eletrônica De Enfermagem**, Goiás, v. 10, n. 1, 2009.

PANDA, Sujogya Kumar; DUTTA Sushil Kumar; BASTIA, Akshya Kumar. Antibacterial activity of *Croton roxburghii* Balak. Against the enteric pathogens. **Journal of Advanced Pharmaceutical Technology & Research**, [s. l.], v. 1, n. 4, p. 419-422, 2010.

PEIXOTO, Rosana N. S. *et al.* Volatiles, A glutarimide alkaloid and antimicrobial effects of *crotonpullei* (Euphorbiaceae). **Molecules**, [s. l.], v. 18, n. 3, p.3195-3205. 2013.

PELEG, Anton Y.; HOGAN, Deborah A.; MYLONAKIS, Eleftherios. Medically important bacterial-fungal interactions. **Nature Reviews Microbiology**, [s. l.], v. 8, n. 5, p. 340-349, 2010.

PEREIRA, Alberto dos Santos *et al.* High-temperature gas chromatography–mass spectrometry with glass capillary columns for the screening of natural products. **Journal of Chromatography**, [s. l.], v. 947, n. 2, p. 255-265, 2002.

PETERS, Brian M. *et al.* Polymicrobial Interactions: Impact on Pathogenesis and Human Disease. **Clinical Microbiology Reviews**, [s. l.], v. 25, n. 1, p. 193-213, 2012.

PFALLER, Michael A.; DIEKEMA, Daniel J. Epidemiology of Invasive Candidiasis: a persistent public health problem. **Clinical Microbiology Reviews**, [s. l.], v. 20, n. 1, p. 133-163, 2007.

RAKHOLIYA, Kalpna D., KANERIA, Mital J., CHANDRA, Sumitra, V. Medicinal plants as alternative sources of therapeutics against multidrug-resistant pathogenic microorganisms based on their antimicrobial potential and synergistic properties. *In*: RAI, Mahendra Kumar; KON, Kateryna Volodymyrivna (Eds.). **Fighting Multidrug Resistance with Herbal Extracts, Essential Oils and Their Components**. [S. l.]: Academic Press, 2013. p. 165-179.

RAMAGE, Gordon *et al.* Candida biofilms: an update. **Eukaryotic Cell**, [s. l.], v. 4, n. 4, p. 633-638, 2005.

REDE DE CATÁLOGOS POLÍNICOS ONLINE. **Rede de catálogos polínicos online**. [S. l.], 2016. Disponível em: <http://chaves.rcpol.org.br/>. Acesso em: 17 nov. 2019.

RICKARD, Alexander H. *et al.* Bacterial coaggregation: an integral process in the development of multi-species biofilms. **Trends in Microbiology**, [s. l.], v. 11, n. 2, p. 94-100, 2003.

RIOU, Mickaël *et al.* Increase of efflux-mediated resistance in *Pseudomonas aeruginosa* during antibiotic treatment in patients suffering from nosocomial pneumonia. **International Journal of Antimicrobial Agents**, [s. l.], v. 47, n. 1, p. 77-83, 2015.

ROCHA, Antônio José *et al.* *Pseudomonas aeruginosa*: virulence factors and antibiotic resistance genes. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, Curitiba, v. 62, 2019.

SADGROVE, Nicholas J.; MADELEY, L. G., & VAN WYK, B.-E. Volatiles from African species of *Croton* (Euphorbiaceae), including new diterpenes in essential oil from *Croton gratissimus*. **Heliyon**, [s. l.], v. 5, 2019.

SCHLAFER, Sebastian, & MEYER, Rikke L. Confocal microscopy imaging of the biofilm matrix. **Journal of Microbiological Methods**, [s. l.], v. 138, p. 50-59, 2017.

SHIRTLIFF, Mark. E; PETERS, Brian M.; JABRA-RIZK, Mary Ann. Cross-kingdom interactions: *Candida albicans* and bacteria. **FEMS Microbiology Letters**, [s. l.], v. 299, n. 1, p.1-9, 2009.

SIDDIQUI, Abdul H.; KOIRALA, Janak. Methicillin in resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA). *In*: **StatPearls**: content is king. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing, 2019. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK482221/>. Acesso em: 26 set. 2019.

SILVA, Jéssica de Andrade Gomes *et al.* Atividade tóxica in vitro de *Croton heliotropiifolius* kunth (Euphorbiaceae). **Revista Verde de Agroecologia e Desenvolvimento Sustentável**, [s. l.], v. 13, n. 1, p. 112-115, 2018.

SIQUEIRA, Clara Margarida Machado. Resistência aos antibióticos: o uso inadequado dos antibióticos na prática clínica. **Resista de la Organización de Farmacéuticos Iberoamericanos**, [s. l.], v. 14, n. 1, p. 45-68, 2004.

SISTEMA DE INFORMAÇÃO SOBRE A BIODIVERSIDADE BRASILEIRA. **Crotonblanchetianus**. Ficha de Espécies. SiBBR. [S. l.], 2019. Disponível em: https://ferramentas.sibbr.gov.br/ficha/bin/view/especie/croton_blanchetianus. Acesso em: 18 dez. 2019.

STEPANOVIC, Srdjan *et al.* A modified microtiter-plate test for quantification of staphylococcal biofilm formation. **Journal of Microbiological Methods**, [s. l.], v. 40, n. 2, p. 175-179, abr. 2000.

SURESH, Maneesha K.; BISWAS, Raja; BISWAS, Lalitha. An update on recent developments in the prevention and treatment of *Staphylococcus aureus* biofilms. **International Journal of Medical Microbiology**, [s. l.], v. 309, n. 1, p. 1-12, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.ijmm.2018.11.002>. Acesso em: 25 dez. 2019.

TRENTIN, Danielle da Silva; GIORDANI, Raquel Brandt; MACEDO, Alexandre José. Biofilmes bacterianos patogênicos: aspectos gerais, importância clínica e estratégias de combate. **Revista Liberato**, Novo Haburgo, v. 14, n. 22, p. 213-236, 2013.

VALLI, Marília; RUSSO, Helena M.; BOLZANI, Vanderlan S. The potential contribution of the natural products from Brazilian biodiversity to bioeconomy. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, [s. l.], v. 90, Supl. 1, p. 763-778, 2018.

WARGO, Matthew J.; HOGAN, A. Deborah. Fungal-bacterial interactions: a mixed bag of mingling microbes. **Current Opinion in Microbiology**, [s. l.], v. 9, n. 4, p. 359-364, 2006.

WILSON, Leslie S *et al.* The direct cost and incidence of systemic fungal infections. **Value in Health: the journal of the International Society for Pharmacoeconomics and Outcomes Research**, [s. l.], v. 5, n. 1, p. 26-34, 2002.

WISPLINGHOFF, Hilmar *et al.* Nosocomial bloodstream infections in US hospitals: analysis of 24.179 cases from a prospective nationwide surveillance study. **Clinical Infectious Diseases**, [s. l.], v. 39, n. 3, p. 309-317, 2004.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Global guidelines for the prevention of surgical site infection**. 2. ed. Geneva: World Health Organization, 2018.

XAVIER, João B. *et al.* Monitorização e modelação da estrutura de biofilme. **Boletim de Biotecnologia**, São Paulo, v. 76, n. 1, p. 2-13, 2005.

XU, Jiancheng *et al.* Surveillance and Correlation of Antimicrobial Usage and Resistance of *Pseudomonas aeruginosa*: a hospital population-based study. **PLoS ONE**, [s. l.], v. 8, n. 11, 2013.