

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE FARMÁCIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

Plantas medicinais do sistema tradicional indígena Mbyá-Guarani:
avaliação das atividades antibiótica, antibiofilme e anti-*Trichomonas vaginalis*

CLARA LIA COSTA BRANDELLI

PORTO ALEGRE, 2012.

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE FARMÁCIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

Plantas medicinais do sistema tradicional indígena Mbyá-Guarani:
avaliação das atividades antibiótica, antibiofilme e anti-*Trichomonas vaginalis*

Dissertação apresentada por
Clara Lia Costa Brandelli para
obtenção do GRAU DE
MESTRE em Ciências
Farmacêuticas

Orientador: Prof. Dr. Alexandre José Macedo

Co-Orientadora: Profa. Dr. Tiana Tasca

Porto Alegre, 2012

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, em nível de Mestrado Acadêmico da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul e aprovada em 13 de julho de 2012, pela Banca Examinadora constituída por:

Profa. Dr. Gilsane Lino Von Poser
Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Profa. Dr. Patricia Valente Da Silva
Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Prof. Dr. Mario Steindel
Universidade Federal de Santa Catarina

Costa Brandelli, Clara Lia
Plantas medicinais do sistema tradicional indígena
Mbyá-Guarani: avaliação das atividades antibiótica,
antibiofilme e anti-Trichomonas vaginalis / Clara
Lia Costa Brandelli. -- 2012.
155 f.

Orientador: Alexandre José Macedo.
Coorientadora: Tiana Tasca.

Dissertação (Mestrado) -- Universidade Federal do
Rio Grande do Sul, Faculdade de Farmácia, Programa
de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Porto
Alegre, BR-RS, 2012.

1. Etnofarmacologia indígena. 2. biofilmes
bacterianos. 3. isolados produtores de Klebsiella
pneumoniae carbapenemase. 4. Trichomonas vaginalis.
I. Macedo, Alexandre José, orient. II. Tasca, Tiana,
coorient. III. Título.

Esta dissertação foi desenvolvida no Laboratório de Biofilmes e Diversidade Microbiana do Centro de Biotecnologia e no Laboratório de Pesquisa em Parasitologia do Departamento de Análises da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul. A estudante recebeu bolsa de estudos da CAPES.

*Aos meus pais, **Oscar e Vera Lúcia**, dedico este trabalho*

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. Alexandre Macedo, por me apoiar e acreditar em mim. Por toda disposição de fazer com que meus sonhos se realizassem e por abraçar minhas ideias. Pelo enorme incentivo durante todo meu trabalho. Pelas conversas, conselhos e risadas.

À Profa. Dr. Tiana Tasca, pelo grande ensinamento que me fez crescer profissionalmente. Pela competência, amizade e alegria que nutrem minha imensa admiração pela professora, orientadora e amiga. Por acreditar em mim e me incentivar sempre.

Ao Cacique José Cirilo Pires Morinico e toda *Tekoá Anhetenguá*, pela acolhida e oportunidade única de aprendizagem, pelos conhecimentos compartilhados e pela experiência que me proporcionaram.

À Profa. Dr. Raquel Giordani por ter despertado em mim a vontade pela ciência, por ter me ajudado de perto e de longe, por ser um exemplo de profissional e pessoa.

Aos meus queridos amigos do Laboratório de Pesquisa em Parasitologia - aos que estão e aos que ali passaram – por fazerem parte da minha história, pela amizade e companheirismo. Agradeço em especial, à Patrícia que está ao meu lado nesses 5 anos de Parasitologia, por toda a ajuda e paciência nos experimentos, mas principalmente por ter se tornado uma pessoa essencial na minha vida.

Aos meus queridos amigos do Laboratório de Biofilmes e Diversidade Microbiana, que apesar da minha passagem ter sido rápida, fizeram com que estes momentos fossem inesquecíveis. Em especial, à Danielle e Karine, pela disposição, atenção e amizade; ao Lucas pela amizade e companheirismo.

À minha amiga Janine, pela amizade, parceria, companheirismo, atenção, apoio e por toda ajuda com os experimentos, ou simplesmente, por existir na minha vida.

Às minhas amigas Simone e Maria Eduarda, pelo carinho e por todos os momentos de apoio incondicional.

Aos meus pais, Oscar e Vera Lúcia, pelo amor e apoio ao longo desses anos, pela compreensão em todos os momentos, por serem meus exemplos de trabalho e dedicação. À minha irmã Isadora, por estar ao meu lado esses anos, e por encher minha vida de amor.

À Dóia e à Dai, por tornar esse período final de trabalho muito mais leve, prazeroso e repleto de companheirismo.

RESUMO

As plantas são amplamente reconhecidas como a principal fonte da maioria dos novos medicamentos, sendo historicamente utilizadas no tratamento e prevenção de doenças. Neste sentido, selecionar plantas usadas tradicionalmente contra doenças infecciosas pode ser uma excelente estratégia para a investigação de novos agentes antimicrobianos, uma vez que os compostos de origem natural fornecem um elevado número de estruturas interessantes. Neste contexto, o objetivo deste trabalho foi buscar e investigar plantas utilizadas no tratamento de doenças infecciosas por indígenas Mbyá-Guarani - Lomba do Pinheiro, Porto Alegre. Foram avaliadas as atividades antibiótica e antibiofilme contra *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, *Staphylococcus epidermidis* ATCC 35984 e isolados clínicos multirresistentes produtores de *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase (KPC). Ainda, a atividade anti-*Trichomonas vaginalis* contra isolados padrões e frescos foi determinada. A triagem dos extratos aquosos revelou que *Campomanesia xanthocarpa*, *Maytenus ilicifolia*, *Bidens pilosa* e *Verbena* sp. apresentaram importantes atividades antibióticas e antibiofilme contra os patógenos testados. O extrato hidroalcoólico de *Luehea divaricata*, permitiu somente 26,9% e 10,5% de formação de biofilme de *P. aeruginosa* e *S. epidermidis*, respectivamente, evidenciado por cinética de crescimento e microscopia eletrônica de varredura. Os extratos aquosos de *Verbena* sp. e *C. xanthocarpa* demonstraram uma forte atividade anti-*T. vaginalis*, com 100% de morte dos trofozoítos na concentração inibitória mínima de 4,0 mg/mL após 4 h de incubação. Os extratos aquosos de *Verbena* sp. e *C. xanthocarpa* e o hidroalcoólico de *L. divaricata* não apresentaram atividade hemolítica contra eritrócitos humanos. Os resultados obtidos confirmam que a sabedoria indígena auxilia no direcionamento da escolha por plantas para a avaliação de atividades biológicas, representando um promissor suporte na pesquisa por agentes antimicrobianos.

Palavras-chave: Etnofarmacologia indígena, Mbyá-Guarani, plantas medicinais, biofilmes bacterianos, isolados produtores de *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase, *Trichomonas vaginalis*.

ABSTRACT

Medicinal plants from the traditional Mbyá-Guarani system: evaluation of antibiotic, antibiofilm and anti-*Trichomonas vaginalis* activities

Plants are extensively recognized as the major source of most new drugs, being historically used in the treatment and prevention of diseases. In this sense, select plants traditionally used against infectious diseases can be an excellent strategy in the investigation of new antimicrobial agents, considering that compounds from natural origin still provide a high number of interesting structures. In this context, the aim of this study was to search and to investigate plants used in the treatment of infectious diseases by indigenous Mbyá-Guarani - Lomba do Pinheiro, Porto Alegre. Antibiotic and antibiofilm activities were evaluated against *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, *Staphylococcus epidermidis* ATCC 35984 and multi-drug resistant *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase (KPC)-producing bacterial clinical isolates. Moreover, the anti-*Trichomonas vaginalis* activity was determinate against long-term grown and fresh isolates. The screening of aqueous extracts revealed that *Campomanesia xanthocarpa*, *Maytenus ilicifolia*, *Bidens pilosa* and *Verbena* sp. showed significant activity against the pathogens tested. *Luehea divaricata* hydroalcoholic extract, allowed only 26.9% and 10.5% of *P. aeruginosa* and *S. epidermidis* biofilm formation, respectively, evidenced by kinetics growth and Scanning Electron Microscopy. The *Verbena* sp. and *C. xanthocarpa* aqueous extracts showed strong anti-*T. vaginalis* activity, with 100% of dead trophozoites at the minimum inhibitory concentration of 4.0 mg/ml after 4 hours of incubation. The *Verbena* sp. and *C. xanthocarpa* aqueous extracts and *L. divaricata* hydroalcoholic extract did not promote a significant hemolytic activity against human erythrocytes. The results obtained confirm that the indigenous wisdom supports in directing the choice of plants for biological activities evaluation, representing a promising support in the search for antimicrobial agents.

Keywords: Indian ethnopharmacology, Mbyá-Guarani, medicinal plants, bacterial biofilms, *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase-producing isolates, *Trichomonas vaginalis*.

SUMÁRIO

I. Introdução Geral	17
I.1. Etnofarmacologia.....	21
I.1.1 Mbyá-Guarani.....	23
I.2 Biofilmes e Bactérias de importância clínica.....	25
I.2.1 Biofilmes bacterianos.....	25
I.2.1.1 <i>Staphylococcus epidermidis</i>	29
I.2.1.2 <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	31
I.2.2 <i>Klebsiella pneumoniae</i> carbapenemase (KPC).....	33
I.3 <i>Trichomonas vaginalis</i>	36
II. Objetivos	41
III. Artigos Científicos	
III.1. CAPÍTULO 1 - <u>Clara Lia Costa Brandelli</u>, Vanessa Bley Ribeiro, Karine Rigon Zimmer, Afonso Luís Barth, Tiana Tasca and Alexandre José Macedo. Mbyá-Guarani medicinal plants against infections: activities upon KPC-producing isolates and biofilm-forming bacteria.....	47
III.2. CAPÍTULO 2 – <u>Clara Lia Costa Brandelli</u>, Patrícia de Brum Vieira, Alexandre José Macedo and Tiana Tasca. Remarkable anti-<i>Trichomonas vaginalis</i> activity of plants traditionally used by the Mbyá-Guarani indigenous group in Brazil.....	73
III.3. CAPÍTULO 3 – <u>Clara Lia Costa Brandelli</u>, Janine Treter, Tiana Tasca and Alexandre José Macedo. <i>In vitro</i> demonstration of the Mbyá-Guarani traditional usage of <i>Luehea divaricata</i> against pathogenic bacterial biofilm.....	97
IV. Discussão Geral	121
V. Conclusões Gerais	129
VI. Perspectivas	133
VII. Referências	137
VIII. Anexos	149

I. Introdução Geral

Produtos naturais e/ou compostos derivados de produtos naturais, como plantas, animais e microrganismos continuam a desempenhar um papel altamente significativo no descobrimento e geração de novos medicamentos para o tratamento de doenças (LI e VEDERAS, 2009). Atualmente, pode-se dizer que estruturas derivadas de produtos naturais têm tido êxito no desenvolvimento de novas terapias. Em termos de número de medicamentos derivados de produtos naturais, as áreas de doenças infecciosas (bacterianas, parasitárias ou virais), seguida de câncer, hipertensão e inflamação, totalizaram 50 terapias aprovadas pela indústria farmacêutica entre 2006 e 2010. A principal categoria dependente de produtos naturais é a de doenças infecciosas - incluindo vacinas antivirais - com 270 novos medicamentos, do total das 1.130 entidades de fonte natural aprovadas entre 01/1981 a 01/2010 (NEWMAN e CRAGG, 2012). Ainda, as plantas são uma fonte importante para a descoberta de medicamentos - especialmente contra parasitos, devido à longa associação entre a coexistência desses patógenos, seres humanos e o uso de plantas para o tratamento (ANTHONY *et al.*, 2005). Destaca-se que 14 medicamentos antiparasitários foram introduzidos no mercado, neste mesmo período, sendo 64,3% produtos naturais ou derivados de produtos naturais. Para a classe de antibacterianos, foram 118 medicamentos, sendo 14 vacinas, totalizando 66% com origem de produtos naturais (NEWMAN e CRAGG, 2012). Neste contexto, a obtenção de compostos ativos a partir de plantas continua a ser uma fonte com alto potencial no meio científico (CORDELL, 1995; PATWARDHAN, 2005).

As plantas e seus extratos têm sido utilizados há séculos como tratamentos de doenças, mas só nos últimos 20-30 anos os pesquisadores começaram a investigar os medicamentos derivados de plantas utilizadas pela medicina tradicional quanto a sua eficácia. Em torno de 25% dos compostos ativos atualmente prescritos nos Estados Unidos e Reino Unido foram isolados a partir de plantas superiores. No entanto, menos de 10% de todas as espécies de plantas do mundo têm sido pesquisadas cientificamente por suas propriedades farmacológicas (ANTHONY *et al.*, 2005). De fato, a complexidade química de muitos produtos naturais e a falta de garantia de uma fonte renovável criaram um desinteresse pela indústria farmacêutica. Em contrapartida, os dados citados anteriormente revelam que os produtos naturais continuam a ter um papel altamente significativo no

desenvolvimento de medicamentos inovadores (NEWMAN e CRAGG, 2012). Neste sentido, a utilização de conhecimento etnofarmacológico é uma forma extraordinária de reduzir passos na busca por plantas com alto potencial e aumentar a probabilidade de sucesso no esforço de descoberta de novas terapias (COS *et al.*, 2006).

As doenças infecciosas causadas por bactérias, fungos, vírus e parasitos ainda são uma grande ameaça à saúde pública, apesar do enorme progresso na medicina e novas terapias. Grande parte deste fato se deve ao aumento progressivo da resistência dos patógenos aos tratamentos existentes. Neste contexto, optou-se neste trabalho por aprofundar o estudo em biofilmes bacterianos formados pelos patógenos *Staphylococcus epidermidis* e *Pseudomonas aeruginosa*, nos isolados clínicos produtores de *Klebsiella pneumoniae* carbapenamase (KPC) e também, no protozoário *Trichomonas vaginalis*.

Biofilmes são comunidades microbianas estruturadas, especialmente mais resistentes às defesas do hospedeiro e à antibioticoterapia, o que leva ao aumento da virulência dos microrganismos e constitui causa comum de infecções bacterianas crônicas (DAVIES, 2003). Igualmente importante, os isolados produtores da enzima KPC, são capazes de hidrolisar um amplo espectro de antibióticos β -lactâmicos, incluindo as penicilinas, cefalosporinas e carbapenêmicos, e estão rapidamente emergindo como uma causa de infecções multirresistentes, tornando-se uma preocupação mundial (HIRSCH e TAM, 2010). Neste mesmo contexto estão as infecções parasitárias, como a tricomonose, a doença sexualmente transmissível (DST) de origem não viral mais comum do mundo, causada pelo protozoário flagelado, *T. vaginalis*, com importante implicação médica, social e econômica (WHO, 2001).

Aliada à necessidade de novos medicamentos antimicrobianos, a etnofarmacologia surge como um contribuinte para o rastreamento sistemático de plantas, proporcionando a descoberta de novos compostos bioativos.

I.1 Etnofarmacologia

Desde tempos remotos, os seres humanos utilizam substâncias químicas derivadas da natureza - plantas, animais e microrganismos - para suas necessidades básicas, incluindo a prevenção e o tratamento de doenças (KOEHN e CARTER, 2005). Ainda hoje, a grande maioria das pessoas recorre às plantas para os cuidados com a saúde (GURIB-FAKIM, 2006). Todos os grupos culturais utilizam plantas como recurso terapêutico e nos centros urbanos, as plantas são uma solução alternativa ou complementar à medicina oficial (KIM, 2005; VENDRUSCOLO e MENTZ, 2006). As pessoas que fazem uso de remédios tradicionais, podem não entender a lógica científica inerente aos medicamentos, mas sabem por experiência própria que algumas plantas podem ser altamente eficazes em doses terapêuticas. A medicina tradicional possui o objetivo de restaurar o equilíbrio, utilizando para este fim, plantas quimicamente complexas, ou uma mistura de diferentes plantas que atuam por sinergismo (GURIB-FAKIM, 2006). Na maioria das sociedades de hoje, os sistemas alopáticos e tradicionais da medicina aconteceram simultaneamente. Este fato é evidenciado pelos dados da Organização Mundial de Saúde (OMS), os quais revelam que cerca de 80% da população de países em desenvolvimento dependem de plantas medicinais para suas necessidades diárias e para os cuidados com a saúde (KIM, 2005).

A etnofarmacologia resgata as informações adquiridas junto a comunidades locais, que possuem um amplo conhecimento oriundo da tradição familiar, e é reconhecida como valiosa estratégia para a avaliação química e farmacológica de plantas medicinais (ELISABETSKY, 2000). Levantamentos etnofarmacológicos fornecem a justificativa para a seleção e investigação científica de plantas medicinais, uma vez que algumas destas têm sido utilizadas com sucesso por um número significativo de pessoas durante longos períodos (WELDEGERIMA, 2009). A abordagem etnofarmacológica resgata informações adquiridas junto a usuários da flora medicinal e quando combinada com estudos químicos e farmacológicos possui um valor inestimável para bioprospecção de medicamentos inovadores, seguros e acessíveis (ELISABETSKY, 2003; PATWARDHAN, 2005). De tal modo, o uso tradicional pode ser encarado como uma pré-triagem quanto à propriedade

terapêutica (ELISABETSKY, 2003). De fato, dos 120 compostos ativos isolados de plantas superiores e utilizados atualmente, 74% têm o mesmo uso terapêutico nas sociedades nativas (MORAN, 2002). A base de dados NAPRALERT revela que entre os 60% das plantas utilizadas tradicionalmente, nenhum composto foi isolado e nem foram conduzidos trabalhos para testar atividade biológica (CORDELL e QUINN-BEATTIE, 2005). Também ocorre uma investigação ainda pobre no Brasil, que possui cerca de 55.000 espécies de plantas, no entanto, apenas 0,4% da flora foram submetidas a algum estudo (GURIB-FAKIM, 2006). Existe, portanto, um grande potencial para a descoberta de novos agentes medicinais.

A etnofarmacologia pode contribuir decisivamente para a exploração de recursos fitoterápicos e para a disseminação do conhecimento com base na eficácia testada dos medicamentos tradicionais. Os povos indígenas que vivem no seu território tradicional em grande parte dependem de plantas medicinais para o tratamento de saúde em sua comunidade. De fato, esta população é reconhecidamente uma guardiã de conhecimentos empíricos e é, portanto, rica em conhecimentos etnofarmacológicos (UPRETY *et al.*, 2010). BUENO *et al.* (2005), descrevem os indígenas da América do Sul como sendo “um dos poucos grupos que possuem uma sabedoria tão ampla sobre propriedades químicas de plantas”. O Brasil é um país dotado de uma biodiversidade extremamente rica, contendo em seu território cinco principais biomas como a floresta amazônica, o cerrado, a mata atlântica, o pantanal e a caatinga. Portanto, é uma imensurável fonte de produtos terapêuticos, considerando que a maior parte de sua flora ainda é desconhecida químico/farmacologicamente (CALIXTO, 2000; ELISABETSKY, 2003). O uso de plantas medicinais no Brasil foi disseminado principalmente pela cultura indígena, visto que estes povos possuem um patrimônio de informações da biodiversidade, além de dominarem a técnica para proveito dos seus recursos (REGO *et al.*, 2010). No entanto, a perda deste conhecimento vem acontecendo em ritmo alarmante. Por exemplo, no Brasil, das 122 culturas indígenas descritas, somente 30% delas foram investigadas em seus aspectos etnobotânicos (COUTINHO *et al.*, 2002). Por isso, é de extrema importância registrar e catalogar o conhecimento tradicional sobre plantas medicinais para prevenir o desaparecimento de informação cultural.

I.1.1 Mbyá-Guarani

Nosso país possui uma imensa diversidade étnica e linguística, estando entre as maiores do mundo. A FUNAI revela que o Brasil possui 460 mil índios, entre 225 sociedades, que totalizam 0,25% da população total brasileira (FUNAI, 2011). Hoje, os Guaranis são um dos grupos indígenas mais numerosos do Brasil (com aproximadamente 34 mil indivíduos), formados por três grandes parcialidades: os *Kayová*, os *Nhandeva* e os *Mbyá*. No país, a população *Mbyá* está estimada em seis mil pessoas e no Rio Grande do Sul são em torno de duas mil. No Rio Grande do Sul, os indígenas situam-se em diversos assentamentos provisórios, localizados na beira das estradas e próximos da área metropolitana de Porto Alegre. Em uma área localizada na Lomba do Pinheiro, os *Mbyá-Guarani* criaram uma aldeia, cuja denominação indígena é *Tekoá Anhetenguá*, que significa “Aldeia da Verdade”, pois, segundo seus moradores, é o espaço em que buscam viver o sistema tradicional Guarani. Este ambiente possui dez hectares de terra e foi, num primeiro momento, designado como lugar de passagem, destinado a abrigar indígenas que se dirigiam à cidade para participar de reuniões, buscar tratamentos de saúde em hospitais, fazer documentos ou vender artesanato. Porém, aos poucos, algumas famílias foram se fixando naquela área, que foi transformada na aldeia Guarani, ocupada pelos *Mbyá-Guarani* segundo seus padrões tradicionais de vida há aproximadamente 20 anos (BERGAMASCHI, 2005). A aldeia possui uma mata relativamente pequena e um açude e os indígenas plantam milho, mandioca, batata-doce e amendoim. Com esforço os habitantes da aldeia mantêm vivo o modo de ser Guarani, realizando seus rituais na *Opy* (casa de reza) cujo acesso está restrito às pessoas Guarani (Figura 1). Esta aldeia é composta de 40 famílias, totalizando 200 pessoas. Todos os indígenas da *Tekoá Anhetenguá* falam o idioma Guarani, reconhecido por eles como *Mbyá* e são liderados pelo cacique José Cirilo Pires Morinico, que mora em uma casa tradicional, de barro e madeira (Figura 2) (SOUZA *et al.*, 2007).

Atualmente, a aldeia está participando do projeto “Ar, Água e Terra: Vida e Cultura Guarani”, patrocinado pelo Programa Petrobrás Ambiental, que desenvolve ações de recuperação e conservação ambiental em oito aldeias Guarani do RS, incentivando o intercâmbio de mudas e sementes entre as aldeias, o plantio de

espécies vegetais nativas, o uso tradicional nas áreas indígenas, a “educação ambiental” e o etnoturismo. Este projeto visa recuperar áreas degradadas, preservar as nascentes e também auxiliar na alimentação dos indígenas. Entre as espécies recebidas, estão algumas que já se encontram em processo de extinção ou de risco, como o pau-amargo e a grápia (IECAM, 2012).



Figura 1. *Opy*, ou casa de reza, é a parte central de uma aldeia. Tribo *Tekoá Anhetenguá*, localizada na Lomba do Pinheiro, Porto Alegre, RS. (Foto: Clara Lia Costa Brandelli, 2012).



Figura 2. Casa tradicional Guarani. Tribo *Tekoá Anhetenguá*, localizada na Lomba do Pinheiro, Porto Alegre, RS. (Foto: Clara Lia Costa Brandelli, 2011).

I.2 Biofilmes e Bactérias de importância clínica

I.2.1 Biofilmes bacterianos

Há algumas décadas, tornou-se claro que algumas infecções bacterianas crônicas são causadas pela capacidade das bactérias de se organizarem em microcolônias chamadas biofilmes (MARRIE *et al.*, 1982). Os biofilmes bacterianos são populações ou comunidades microbianas complexas que vivem organizadas e aderidas a uma superfície, embebidas em uma matriz composta de substância extracelular polimérica (EPS), tornando-os capazes de sobreviver em ambientes hostis (GARRETT *et al.*, 2008).

A adesão bacteriana na superfície de um material pode ser descrita em um processo que inclui duas etapas: o processo de adesão inicial, instantâneo e reversível seguido por um processo irreversível devido à produção de exopolissacarídeos (KATSIKOIANNI e MISSIRLIS, 2004). A adesão é iniciada quando uma bactéria planctônica se adere a uma superfície biótica ou abiótica. Após esta adesão inicial, as células passam por mudanças fisiológicas programadas formando microcolônias envolvidas por uma matriz protetora composta de uma substância extracelular polimérica (EPS), caracterizando a adesão irreversível. Essas microcolônias são separadas por canais de água, formando estruturas semelhantes a cogumelos, que funcionam como um sistema circulatório de entrega de nutrientes e remoção de metabólitos (DAVIES, 2003). Ocorre a maturação e o desenvolvimento do biofilme, levando à formação de uma comunidade sésil microbiana altamente estruturada e dinâmica (COSTERTON *et al.*, 1999). Quando o biofilme atinge uma determinada massa crítica e o equilíbrio dinâmico é alcançado, as camadas mais externas do biofilme começam a liberar células planctônicas, que rapidamente podem se dispersar e se multiplicar, colonizando novas superfícies (DAVIES, 2003) (Figura 3).

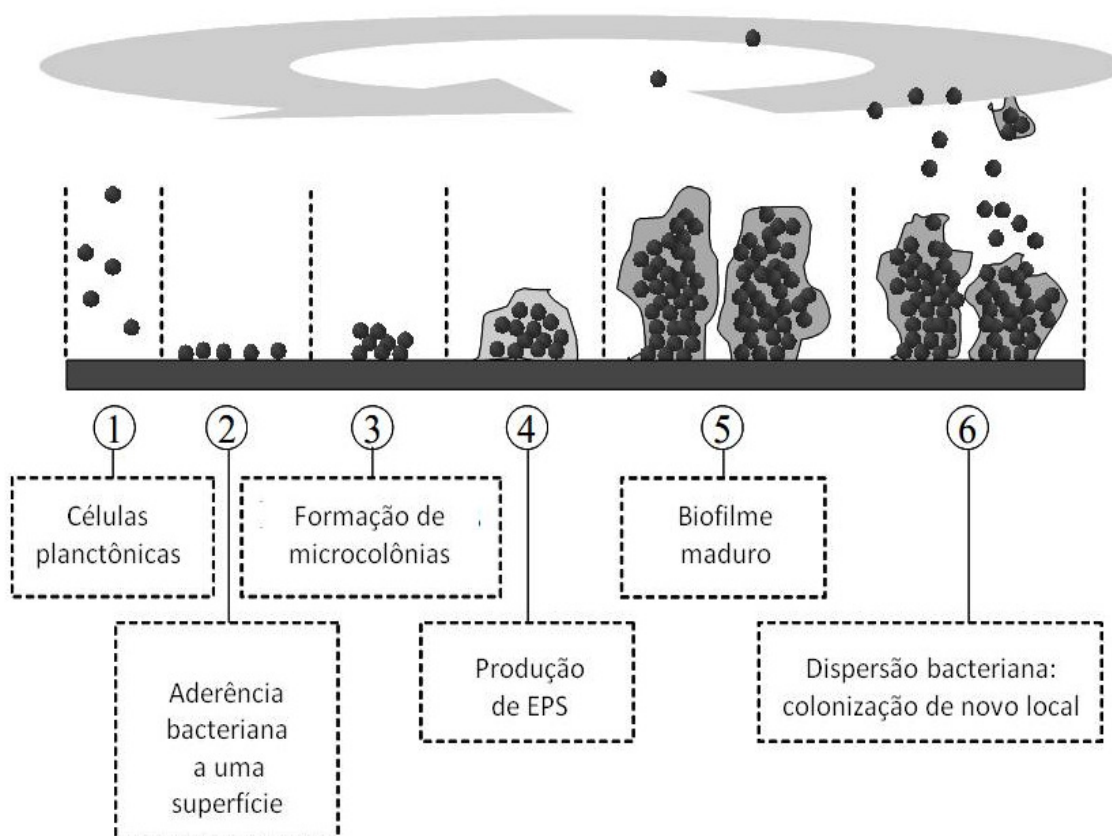


Figura 3. Processo esquemático da formação de biofilmes bacterianos. Adaptado: TRETER e MACEDO, 2011.

Um fator fundamental para o crescimento e desenvolvimento de biofilmes bacterianos são os eventos de sinalização, conhecida como *quorum sensing*. Sistemas de *quorum sensing* em bactérias vêm sendo caracterizados por regularem diversas funções celulares, incluindo luminescência, formação de biofilmes, produção de antibióticos, expressão do fator de virulência, entre outros (FUQUA e GREENBERG, 1998). Este sistema de sinalização é requerido para a virulência de diversos patógenos, como *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus* e *Staphylococcus epidermidis*, entre outros (DIGGLE, 2007). Moléculas, chamadas de autoindutoras, são produzidas, liberadas e detectadas por células bacterianas no ambiente, podendo interagir com células vizinhas. Conforme a densidade bacteriana aumenta, as moléculas autoindutoras podem acumular a um limiar de concentração e induzir a transcrição de genes específicos (DAVIES, 2003). Diversos sinais têm sido descobertos, dentre eles estão as acil-homoserinolactonas (AHL) ou autoindutor-1 em bactérias gram-negativas, peptídeos cíclicos em gram-positivas e

um sinalizador de ambos os microrganismos, o furanosil diester borato ou autoindutor-2 (CHEN *et al.*, 2002; TAGA e BASSLER, 2003).

Devido à natureza protetora do biofilme, as bactérias, quando aderidas a uma superfície, são extremamente resistentes, tornando-se de 10 a 1.000 vezes menos suscetíveis a agentes antimicrobianos e à resposta imune do hospedeiro, se comparadas a células planctônicas (GILBERT *et al.*, 1990; DAVIES, 2003). Vários fenômenos têm sido sugeridos para explicar esta extraordinária resistência dos biofilmes bacterianos aos antibióticos. Um dos mecanismos da resistência dos biofilmes é a falha do agente antimicrobiano em penetrar na profundidade total desta biomassa. Isso porque a estrutura do biofilme pode reduzir fisicamente a penetração dos antibióticos por proteger as regiões internas. Além disso, a matriz polimérica (EPS) do biofilme é conhecida por retardar a difusão dos antibióticos, onde o EPS atua como um trocador iônico e sequestra antimicrobianos hidrofílicos e carregados positivamente, tais como os aminoglicosídeos. A segunda hipótese para explicar esta reduzida susceptibilidade aos antibióticos relata que algumas das células (principalmente aquelas que se encontram na base dos biofilmes) vivem em uma diminuída taxa metabólica, por isso, crescem lentamente, sendo chamadas de células dormentes. Estas bactérias garantem a resistência ao tratamento aos antimicrobianos que agem na fase de crescimento bacteriano como: síntese protéica, de ácidos nucleicos e de parede celular, podendo explicar a baixa susceptibilidade às penicilinas, aos aminoglicosídeos e às quinolonas. Esta heterogeneidade celular dentro de um biofilme constitui uma estratégia de sobrevivência importante quando houver tratamento com antibióticos. A terceira possibilidade de mecanismo de resistência é que as células do biofilme são fisiologicamente distintas das bactérias planctônicas e expressam fatores de proteção específicos, tais como bombas de efluxo de antibióticos (COSTERTON *et al.*, 1999; DONLAN e COSTERTON 2002; DAVIES 2003).

Neste sentido, a formação de biofilmes é uma causa comum de cronicidade das infecções, pois a antibioticoterapia normalmente reverte os sintomas causados por células planctônicas, mas não consegue eliminá-lo e é por isso que estas infecções geralmente apresentam sintomas recorrentes (COSTERTON *et al.*, 1999).

Estima-se que de todas as infecções bacterianas em seres humanos, 80% estejam associadas à formação de biofilmes, como por exemplo: fibrose cística, otite, feridas crônicas, infecções do trato urinário, colite, vaginite, conjuntivite, uretrite, entre outras (DAVIES, 2003; FUX *et al.*, 2005). Os biofilmes também são importantes colonizadores de dispositivos médicos, incluindo cateter urinário, venoso e arterial. Além disso, respiradores, lentes de contato, implantes artificiais (por exemplo, válvulas cardíacas, marca-passos, enxertos vasculares sintéticos e *stents*), próteses urinárias e próteses ortopédicas, também podem ser infectados por biofilmes (COSTERTON *et al.*, 1999; DAVIES, 2003; BURMØLLE *et al.*, 2010).

O comprometimento da adesão microbiana e a formação de biofilmes são conceitos inovadores de terapia, pois exploram um mecanismo de ação diferente do convencional, dificultando o surgimento de resistência. Neste contexto, é fundamental a investigação de compostos bioativos que evitem a expressão de fatores de virulência, entre eles a formação do biofilme. A maioria dos estudos sobre a atividade antimicrobiana de extratos de plantas tem sido restrita à análise de suas propriedades bacteriostáticas e bactericidas, enquanto que estudos sobre atividade antibiofilme são limitados. Uma mudança no foco das pesquisas fornece uma nova visão para o tratamento destas infecções. Entre os principais agentes causadores de infecções nosocomiais estão *S. epidermidis*, *P. aeruginosa* e mais recentemente vem alarmando o sistema de saúde as bactérias produtoras de *Klebsiella pneumoniae* carbapenemases (KPC).

1.2.1.1 *Staphylococcus epidermidis*

Staphylococcus epidermidis é, primeiramente, uma bactéria da microbiota normal da pele humana saudável e mucosas, além de ser um organismo comensal de baixa patogenicidade. Na verdade, *S. epidermidis* raramente causa doenças em pacientes ambulatoriais imunocompetentes. Entretanto, nas últimas décadas, esta bactéria emergiu como uma causa comum de numerosas infecções nosocomiais, particularmente em dispositivos médicos, como cateter venoso central, prótese de

articulações, marcapassos cardíacos, válvulas cardíacas, lentes artificiais, implantes mamários, *stents*, dentre outros (ZIEBUHR *et al.*, 2006; OTTO, 2009, TRETER e MACEDO, 2011; AYBAR *et al.*, 2012). Infecções por *S. epidermidis* preferencialmente afetam imunodeprimidos, pacientes em longas hospitalizações e em estado crítico. Embora estas infecções raramente evoluem para doenças graves, a sua frequência e o fato de que são extremamente difíceis de tratar, representam um sério problema para o sistema público de saúde. Estima-se que os custos relacionados às infecções associadas à cateteres por *S. epidermidis* sejam em torno de US\$ 2 bilhões anualmente nos Estados Unidos (OTTO, 2009). Por consequência, as infecções relacionadas a implantes médicos passaram a representar um sério problema.

O tratamento de infecções por *S. epidermidis* é complicado, devido à presença de genes específicos de resistência aos antibióticos e também devido à formação de biofilmes (AYBAR *et al.*, 2012). Até o momento, nenhum tratamento eficiente para infecções de implantes médicos foi proposto, sendo a única alternativa a remoção do dispositivo médico para que haja um aumento na eficiência da antibioticoterapia (JABBOURI e SADOVSKAYA, 2010). Além da problemática da formação de biofilme por *S. epidermidis*, os isolados nosocomiais desta bactéria são caracterizados pela pronunciada resistência contra muitos antibióticos atualmente utilizados, incluindo a meticilina - o fármaco de primeira escolha contra infecções por *Staphylococcus* (ZIEBUHR *et al.*, 2006). A vancomicina tem sido utilizada no tratamento de 80% destas infecções resistentes à meticilina, para que não haja remoção do dispositivo médico. Porém, estudos recentes demonstram que tigeclina – antibiótico de amplo espectro que possui atividade contra a maioria dos patógenos gram-positivos, incluindo os isolados resistentes à meticilina – possui uma atividade superior que a vancomicina, no tratamento de infecções associadas à cateter (AYBAR *et al.*, 2012).

Levando em consideração a significativa problemática envolvendo infecções nosocomiais por biofilmes de *S. epidermidis*, novas estratégias oriundas de produtos naturais que interfiram na adesão microbiana a fim de evitar a formação de biofilmes, são necessárias. TRENTIN *et al.* (2011) demonstraram que plantas do

bioma caatinga possuem uma importante atividade na prevenção da formação de biofilmes por esta bactéria. A atividade antibiofilme contra *S. epidermidis* de diterpenóides isolados de plantas utilizadas na medicina tradicional européia também apresentou excelentes resultados (KUZMA *et al.*, 2007). Plantas utilizadas na medicina popular para diversas doenças infecciosas são fontes promissoras de compostos que agem na prevenção da formação de biofilmes por *S. epidermidis*, como demonstrado por WANG *et al.* (2009), ARTINI *et al.* (2012) e SAITO *et al.* (2012).

1.2.1.2 *Pseudomonas aeruginosa*

Pseudomonas aeruginosa, é um bacilo gram-negativo não fermentador, considerado o patógeno humano oportunista mais importante desta classe, pois é geralmente encontrado em indivíduos imunocomprometidos, incluindo pacientes com severas queimaduras, com câncer, aids e portadores de fibrose cística (FC). Este microrganismo pode causar meningite (geralmente seguida por trauma ou cirurgia), otite externa em diabéticos, endocardite ou osteomielite em pacientes com medicação endovenosa, pneumonia, infecções no trato urinário e peritonites (COSTERTON, 1999).

Em comparação com outros agentes patogênicos, a *P. aeruginosa* é extremamente difícil de erradicar, pois exibe uma elevada resistência intrínseca para uma grande variedade de antibióticos, incluindo aminoglicosídeos, fluoroquinolonas e β -lactâmicos. Esta resistência é devida, principalmente, à baixa permeabilidade da membrana externa bacteriana, que limita a taxa de penetração dos antibióticos. Além da resistência intrínseca, a *P. aeruginosa* possui outros dois mecanismos de resistência: adaptativa e adquirida. A resistência intrínseca tem como mecanismos: diminuição da permeabilidade da membrana externa, produção de β -lactamases (que torna a bactéria resistente à ampicilina, amoxicilina, amoxicilina-clavulanato, cefotaxima e ceftriaxona) e o aumento da expressão da bomba de efluxo (capaz de expulsar o agente antimicrobiano da célula). Já a resistência adaptativa é induzida e

depende da presença contínua de antibióticos, ou do estímulo ambiental, e ocorre por mudanças nas expressões gênicas. A resistência adquirida ocorre devido a mutações que levam à absorção reduzida e à superexpressão da bomba de efluxo (BREIDENSTEIN *et al.*, 2011).

A característica principal de pacientes com FC é a perda progressiva da função pulmonar causada por infecção bacteriana persistente e recorrente, geralmente por *P. aeruginosa*, o agente patogênico dominante das vias áreas destes pacientes. Em adolescentes portadores de FC, 80% são cronicamente infectados por *P. aeruginosa* (HEIJERMAN, 2005; MOREAU-MARQUIS *et al.*, 2008). Essas infecções crônicas estão associadas aos piores prognósticos dos pacientes com FC, visto que uma vez estabelecidas, não são erradicadas pelos atuais antibióticos. Eventualmente, os pacientes com FC sucumbem ao dano pulmonar causado pela infecção bacteriana e possuem uma expectativa de vida média de 30 anos (COSTERTON, 1999). Além de todos os mecanismos de resistência, uma razão importante para a infecção persistente da *P. aeruginosa* é a sua capacidade de formar biofilmes nos pulmões dos pacientes com FC. Dados revelam que existem numerosos fatores no pulmão do paciente com FC que facilitariam a formação de biofilme: (i) camada de muco que fornece um ambiente anaeróbio ou microaerófilo propício ao crescimento de *P. aeruginosa*; (ii) redução na secreção de compostos bactericidas nas vias aéreas FC; (iii) aumento dos níveis de DNA e de actina que contribuem com sítios de colonização e/ou componentes da matriz EPS dos biofilmes; e (iv) secreções por células das vias respiratórias (MOREAU-MARQUIS *et al.*, 2008).

A antibioticoterapia em pacientes colonizados com *P. aeruginosa* ameniza os sintomas, entretanto, não produz a cura completa. Certamente, os antibióticos atuam sobre as células planctônicas que são disseminadas pelos biofilmes, aliviando os sintomas agudos da infecção pulmonar, mas não há eliminação do biofilme (COSTERTON, 1999; MOREAU-MARQUIS *et al.*, 2008).

Considerando as múltiplas maneiras em que a *P. aeruginosa* pode tornar-se resistente, é extremamente difícil, e ao mesmo tempo necessário, encontrar novos

medicamentos e mecanismos de ação diferenciados contra este patógeno. Frações ricas em taninos, derivadas de extratos de plantas, demonstraram excelente atividade anti-*quorum sensing* e por consequência, evitaram a formação de biofilmes por *P. aeruginosa* (TAGANNA *et al.*, 2011). Fracionamentos bioguiados de plantas também trazem resultados promissores para a inibição da formação de biofilme por esta bactéria (SAITO *et al.*, 2012). Plantas da medicina tradicional são fontes promissoras de moléculas tanto anti-*quorum sensing* quanto antibiofilme para *P. aeruginosa*, como demonstrado em um recente estudo por ABRAHAM *et al.* (2011).

I.2.2 Bactérias produtoras de *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase (KPC)

Nos últimos 10 anos, a disseminação da enzima *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase (KPC) levou ao aumento na prevalência mundial de enterobactérias resistentes aos carbapenêmicos, sendo que existem opções limitadas de tratamento destas infecções levando a altas taxas de mortalidade. Esta carbapenemase foi inicialmente detectada em isolados de *K. pneumoniae*, mas hoje tem sido identificada em outros membros das enterobactérias, além de *Acinetobacter baumannii* e *Pseudomonas aeruginosa* (GUPTA *et al.*, 2011).

Os carbapenêmicos – imipenem, meropenem, ertapenem e doripenem – são os medicamentos de primeira escolha em infecções severas causadas por enterobactérias produtoras de β -lactamases de espectro estendido, as chamadas ESBLs (PATEL *et al.*, 2011). As ESBLs são enzimas que hidrolisam praticamente todos os antibióticos β -lactâmicos (penicilina e seus derivados, e cefalosporinas), exceto os carbapenêmicos e cefamicinas (cefexitina) (NORDMANN *et al.*, 2012). Ainda, estas enzimas são inibidas por ácido clavulânico, sulbactam e tazobactam (BEIRÃO *et al.*, 2010).

O surgimento de enterobactérias produtoras de ESBLs resistentes aos carbapenêmicos é extremamente preocupante, uma vez que, conseqüentemente, as opções de tratamento tornam-se muito limitadas (NORDMANN *et al.*, 2009). A

resistência aos carbapenêmicos pode envolver mecanismos combinados: (i) diminuição na absorção de antibióticos por uma deficiência qualitativa ou quantitativa na expressão da porina, em associação com a superexpressão de β -lactamases que possuem afinidade muito fraca para carbapenêmicos; e (ii) produção específica de enzimas que hidrolisam carbapenêmicos, as carbapenemases (NORDMANN *et al.*, 2012).

A serino-carbapenemase - pertencente à Classe A de Ambler (carbapenemases inibidas por ácido clavulânico), mais comum é a *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase (KPC) mediada por plasmídeos, que é capaz de hidrolisar β -lactâmicos, incluindo penicilinas, cefalosporinas, carbapenêmicos e aztreonam (GUPTA *et al.*, 2011). Além disso, existem 11 variantes de KPC (KPC-2 a KPC-12), sendo a KPC-2 e KPC-3 as mais predominantes (NORDMANN *et al.*, 2012). Estas enzimas estão principalmente associadas com *K. pneumoniae*, embora os produtores KPC de outras espécies de Enterobacteriaceae, *Pseudomonas* e *Acinetobacter*, são cada vez mais frequentes (ANDRADE *et al.*, 2011). Sabe-se que em *P. aeruginosa*, a produção de KPC pode resultar em altos níveis de resistência aos carbapenêmicos (BUSH, 2010).

Infecções causadas por bactérias produtoras KPC estão se tornando um problema cada vez mais significativo em contexto mundial (ARNOLD *et al.*, 2011). Após a primeira detecção destas enzimas, em 1996, em isolados nos Estados Unidos, houve raros eventos. Entretanto, em 2001 vários surtos de bactérias multirresistentes ocorreram em hospitais localizados na região de Nova Iorque. Em poucos anos, as bactérias produtoras de KPC se disseminaram amplamente e têm sido identificadas em todo o território dos Estados Unidos, assim como Porto Rico, Colômbia, Itália e China. Os surtos de cepas produtoras de KPC também têm sido relatados em muitos países europeus e na América do Sul. Situações epidêmicas também foram relatadas em Israel e na Grécia (HIRSCH e TAM, 2010; BEIRÃO *et al.*, 2011; NORDMANN *et al.*, 2012). A disseminação mundial e os países onde isolados produtores de KPC foram relatados entre 2001 e 2011 estão demonstrados na Figura 4. Até o momento, apenas casos esporádicos de *K. pneumoniae*,

Enterobacter cloacae, *Serratia marcescens* e *Escherichia coli* produtores de KPC-2 foram documentados no Brasil (ANDRADE *et al.*, 2011).

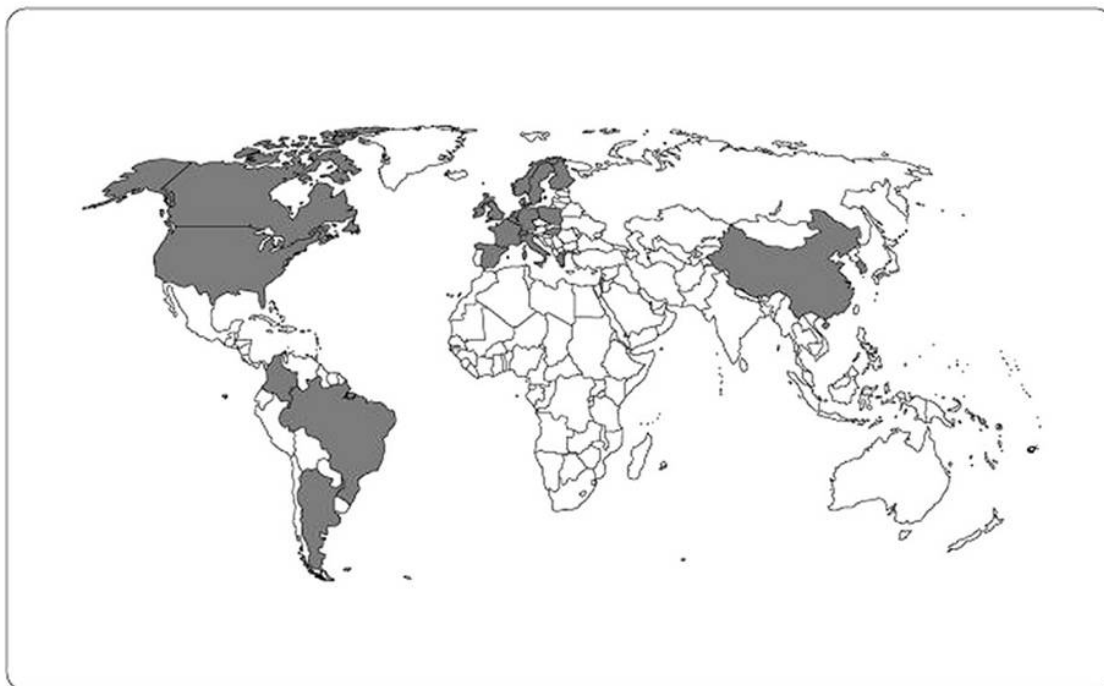


Figura 4. Disseminação internacional de enterobactérias produtoras de *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase (KPC) entre 2001 e 2011. Fonte: GUPTA *et al.*, 2011 (Permissão de uso no anexo VIII).

A mortalidade atribuída a infecções devidas aos isolados produtores de KPC é extremamente elevada (50% ou mais); em parte devido ao fato destas bactérias serem normalmente resistentes a múltiplos antibióticos – o que conduz à falha na terapia de primeira escolha - e também devido às limitadas opções de terapias atuais (NORDMANN *et al.*, 2012). Embora as KPCs não representem o primeiro ou o único mecanismo de resistência aos carbapenêmicos, elas são notáveis, porque muitas vezes não são detectadas pela triagem de suscetibilidade de rotina e possuem um potencial excepcional para disseminação. Estas infecções não são órgão ou tecido-específicas; a maioria das infecções é sistêmica, ocorrendo em pacientes com múltiplos dispositivos invasivos ou com infecções do trato urinário - particularmente em pacientes imunocomprometidos (NORDMANN *et al.*, 2009). Existem ainda, fatores de risco para tais infecções, como: idade avançada,

hospitalização prolongada, unidade de tratamento intensivo (UTI), antibioticoterapia prévia, transplante de órgãos ou células tronco, ventilação mecânica e internação hospitalar prolongada (NORDMANN *et al.*, 2009; ARNOLD *et al.*, 2011).

As opções de tratamento em pacientes infectados por bactérias produtoras de KPC são limitadas porque o tratamento ideal ainda carece de padronização (HIRSCH e TAM, 2010). Com a disseminação de bactérias produtoras de KPC, a conduta clínica terapêutica cada vez mais adotada tem sido as polimixinas e a tigeciclina (BEIRÃO *et al.*, 2011). A polimixina tem sido a única opção em casos de infecções por gram-negativos pan-resistentes, porém, apresenta alta toxicidade. Já a tigeciclina tem demonstrado importante atividade *in vitro* contra esses isolados (ARNOLD *et al.*, 2011).

A propagação mundial de Enterobacteriaceae produtoras de KPC representa, atualmente, uma significativa ameaça para a saúde pública e requer esforços na detecção e estratégias para o controle destas infecções. Existe a necessidade de estudar combinações de terapias e novas estratégias para um tratamento racional. Não existem até o momento, estudos de produtos naturais com atividade contra estes isolados bacterianos, sugerindo que seja um campo novo e promissor, que pode auxiliar na busca de novos tratamentos.

1.3 *Trichomonas vaginalis*

Trichomonas vaginalis é um protozoário flagelado que pertence à família Trichomonadidae, à ordem Trichomonadida, à classe Parabasalia e ao filo Zoomastigina (SCHEWEBKE e BURGESS, 2004). Este protozoário possui apenas estágio morfológico de trofozoíto, de formato piriforme, elipsoide ou oval (DE CARLI, 2007). O trofozoíto de *T. vaginalis* apresenta: (i) quatro flagelos anteriores livres; (ii) um flagelo recorrente aderido ao corpo pela costa, formando a membrana ondulante; (iii) um núcleo proeminente que frequentemente apresenta nucléolo; (iv) uma estrutura rígida e hialina, chamada de axóstilo, que se projeta de uma extremidade

à outra da célula; (v) hidrogenossomos, que apresentam funções metabólicas similares às mitocôndrias (BENCHIMOL, 2004) (Figura 5). O protozoário é extremamente plástico e forma pseudópodes para capturar alimentos e se fixar em superfícies sólidas (HONIGBERG e BRUGEROLLE, 1990). A aderência do trofozoíto às células epiteliais vaginais provoca a alteração da sua forma piriforme para ameboide, permitindo ao parasito um íntimo contato com a célula hospedeira (ARROYO *et al.*, 1992).

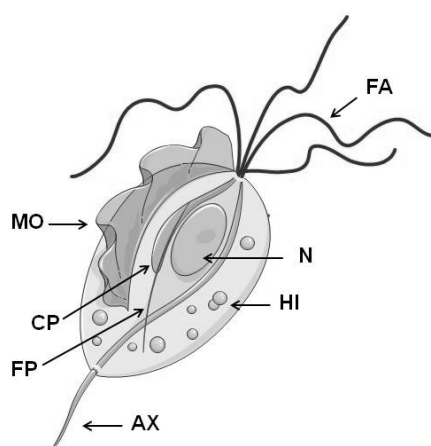


Figura 5. Morfologia do trofozoíto de *Trichomonas vaginalis*: AX: axóstilo, CP: corpo parabasal, FA: flagelos anteriores livres, FP: filamento parabasal, HI: hidrogenossomo, MO: membrana ondulante, N: núcleo. (Fonte: <http://www.servier.fr/servier-medical-art>).

T. vaginalis coloniza o trato urogenital humano e é o agente causador da tricomonose, a doença sexualmente transmissível (DST) não viral mais comum no mundo. Segundo dados da Organização Mundial da Saúde (OMS), cerca de 340 milhões de novos casos de infecções sexualmente transmissíveis ocorreram no mundo em 1999 (WHO, 2001). Há estimativas que ocorram 174 milhões de novos casos por ano de tricomonose, e destes, 154 milhões ocorrem em localidades com recursos limitados (JOHNSTON e MABEY, 2008). A incidência da infecção por *T. vaginalis* é mais frequente que as infecções causadas por *Chlamydia trachomatis* (92 milhões) e *Neisseria gonorrhoeae* (62 milhões). Apesar destes números alarmantes, os dados de prevalência e incidência ainda podem estar subestimados devido ao diagnóstico laboratorial de baixa sensibilidade e devido à negligência na

falta de documentação dos mesmos (FICHOROVA, 2009). Por exemplo, nos Estados Unidos, estima-se que ocorram 7,4 milhões de novos casos anualmente (SUTCLIFFE *et al.*, 2010), enquanto em países africanos, sabe-se que as taxas de tricomonose em mulheres são elevadas, mas em homens esta estimativa ainda é desconhecida (NWEZE e MOUNEKE, 2011).

As manifestações clínicas da tricomonose em mulheres variam desde casos assintomáticos até severa vaginite. Em casos sintomáticos da doença, a infecção é caracterizada por prurido local com corrimento vaginal espumoso, amarelo ou esverdeado e mucopurulento, dor abdominal baixa e disúria (REIN, 1990; LEHKER e ALDERETE, 2000). Além disso, são observados em apenas 2 a 5% dos casos, sinais ou sintomas inflamatórios específicos de tricomonose, com pequenos pontos hemorrágicos na mucosa vaginal ou da cérvix, acompanhados de edema e eritema, o que confere uma aparência conhecida como *colpitis macularis* ou aspecto de morango (PETRIN *et al.*, 1998; SCHWEBKE e BURGESS, 2004). Os sintomas da tricomonose são cíclicos e, geralmente, tornam-se piores durante ou imediatamente após o período menstrual (PETRIN *et al.*, 1998). Homens com tricomonose são na maioria assintomáticos, sendo que alguns podem apresentar somente uma infecção autolimitada, facilitando desta forma, a transmissão da doença (PETRIN *et al.*, 1998). No entanto, em alguns casos, os sintomas são clinicamente inespecíficos, revelando uma uretrite purulenta, disúria e raro prurido ou ardência imediatamente após relação sexual, os quais caracterizam uretrites não-clamidal e não-gonococal (PETRIN *et al.*, 1998; BAKARE *et al.*, 1999).

Ao contrário do que se observa em muitos casos nos quais a infecção é facilmente tratada, a tricomonose pode causar sérias consequências de saúde, incluindo complicações na gravidez (COTCH *et al.*, 1997; KLEBANOFF *et al.*, 2001), infertilidade (GRODSTEIN *et al.*, 1993), predisposição ao câncer cervical (VIIKKI *et al.*, 2000) e doença inflamatória pélvica (CHERPES *et al.*, 2006). Também pode envolver consequências que incluem uretrite, prostatite, epididimite, endometrite, piossalpinge e associação com vaginose bacteriana (PETRIN *et al.*, 1998; FICHOROVA, 2009). Além disso, considera-se que a complicação mais significativa gerada pela tricomonose seja a sua atuação como um co-fator para a transmissão e

aquisição do vírus da imunodeficiência humana adquirida (HIV) (VAN DER POL *et al.*, 2008). Este aspecto é sustentado pelos seguintes fatores: a) a inflamação do epitélio vaginal ou uretral causada pelo patógeno induz a resposta imune, levando ao recrutamento de linfócitos CD4+ e macrófagos, células hospedeiras do vírus (LEVINE *et al.*, 1998); b) os pontos hemorrágicos na mucosa vaginal ou cervical comprometem a barreira mecânica ao HIV (MC CLELLAND *et al.*, 2007); e finalmente, c) alguns estudos têm associado a tricomonose com elevados níveis seminais de HIV em homens com infecção pelo HIV e uretrite sintomática (HOBBS *et al.*, 1999).

Os fármacos de escolha para o tratamento desta parasitose são os derivados dos 5'-nitroimidazóis: metronidazol e tinidazol, os únicos aprovados pelo *Food and Drug Administration* (FDA, EUA). Estes compostos são administrados na forma de pró-fármaco, sendo intracelularmente ativados pela redução do grupamento nitro para seu estado tóxico. Sugere-se que esta ativação ocorra nos hidrogenossomos, mediada pela ação da enzima piruvato-ferredoxina oxidoreductase (PFOR) (KULDA, 1999) ou ainda, pela via da nicotinamida adenina dinucleotídeo reduzida (NADH) desidrogenase (HRDÝ *et al.*, 2005). Recentemente, foi proposto que o metronidazol é ativado via tiorredoxina redutase citosólica (LEITISCH *et al.*, 2009). Diversos efeitos adversos associados ao metronidazol são relatados como náusea, vômito, diarreia, desconforto abdominal, intolerância ao álcool tipo dissulfiram, vertigens, paralisias e, raramente, encefalopatias ou convulsões. Efeitos carcinogênicos e teratogênicos também já foram reportados (ALI e NOZAKI, 2007). O metronidazol é bastante eficaz contra a tricomonose, porém, falhas no tratamento podem ser observadas. Frequentemente ocorre a não adesão ao tratamento, reinfecção e também a pobre absorção do fármaco ou a biodisponibilidade insuficiente (LUMSDEN *et al.*, 1988). Além disso, ainda há outras barreiras significativas na redução da carga global de infecções por *T. vaginalis* (CUDMORE e GARBER, 2010). A principal delas é o desenvolvimento de isolados resistentes de *T. vaginalis*, que somam em torno de 9,6% dos casos (SCHWEBKE e BARRIENTES, 2006). Essa resistência ao metronidazol pode ser devida à redução das funções dos hidrogenossomos e atividade da enzima PFOR (BORST e OUELLETTE, 1995;

KULDA 1999) e também à diminuição da atividade de tiorredoxina redutase (LEITSCH *et al.*, 2009).

De acordo com a revisão apresentada, observa-se aspectos importantes como (i) o impacto da tricomonose na saúde pública, (ii) o número de casos negligenciados por falha no tratamento ou no diagnóstico, (iii) o limitado arsenal terapêutico disponível; e (v) o crescente número de isolados resistentes aos fármacos disponíveis. Neste sentido, tratando-se de produtos naturais, pesquisas estão sendo desenvolvidas utilizando plantas medicinais de diversas biodiversidades para a descoberta de novos medicamentos, não-tóxicos e custo-efetivos para o tratamento deste problema de saúde pública mundial. Extratos e compostos isolados de plantas selecionadas com base no uso popular também estão demonstrando ser uma fonte de novos protótipos para o desenvolvimento de agentes anti-*T. vaginalis*. Recentemente, plantas da caatinga tradicionalmente utilizadas para o tratamento de DSTs apresentaram uma potencial atividade anti-*T. vaginalis* (FRASSON *et al.* 2012). CALZADA *et al.* (2007) demonstraram que plantas utilizadas para doenças do trato urogenital na medicina tradicional do México revelaram efeito contra este protozoário. Alcaloides isolados de plantas da família Amaryllidaceae, que são utilizadas contra doenças venéreas na África do Sul, também apresentaram atividade promissora contra *T. vaginalis* (GIORDANI *et al.*, 2010; GIORDANI *et al.*, 2011a; GIORDANI *et al.*, 2011b; VIEIRA *et al.*, 2011).

II. Objetivos

II.1 Objetivo geral

O objetivo geral desse estudo foi investigar através da medicina tradicional indígena Mbyá-Guarani, plantas medicinais com promissora atividade biológica contra biofilmes bacterianos patogênicos, isolados produtores de *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase e *Trichomonas vaginalis*, contribuindo para comprovação científica do uso tradicional e para o desenvolvimento de terapias inovadoras no combate a estes patógenos.

II.2 Objetivos específicos

- Buscar plantas medicinais utilizadas na medicina tradicional indígena para o tratamento de doenças infecciosas;
- Obter extratos similares aos utilizados tradicionalmente, bem como extratos de diferentes polaridades;
- Avaliar as atividades antibiótica e antibiofilme contra bactérias modelos de formação de biofilme: *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 e *Staphylococcus epidermidis* ATCC 35984;
- Avaliar a atividade antibiótica e antibiofilme contra isolados clínicos produtores de *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase;
- Avaliar a atividade anti-*T. vaginalis* de isolados provenientes de pacientes do sexo feminino (padrões e frescos) e masculinos (frescos);
- Investigar parcialmente o mecanismo de ação dos extratos bioativos sobre *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, *Staphylococcus epidermidis* ATCC 35984 e *Trichomonas vaginalis*.

III. Artigos Científicos

III.1. CAPÍTULO 1 - Clara Lia Costa Brandelli, Vanessa Bley Ribeiro, Karine Rigon Zimmer, Afonso Luís Barth, Tiana Tasca and Alexandre José Macedo. **Medicinal plants used by a Mbyá-Guarani tribe against infections: activity on KPC-producing isolates and biofilm-forming bacteria**

Medicinal plants used by a Mbyá-Guarani tribe against infections: activity on KPC-producing isolates and biofilm-forming bacteria

Clara Lia Costa Brandelli^{1,2}
Email: claralia@gmail.com

Vanessa Bley Ribeiro^{1,3}
Email: vanebley@hotmail.com

Karine Rigon Zimmer²
Email: karorzimmer@gmail.com

Afonso Luís Barth^{1,3}
Email: albarth@hcpa.ufrgs.br

Tiana Tasca¹
Email: tiana.tasca@ufrgs.br

Alexandre José Macedo^{1,2,*}
Email: alexandre.macedo@ufrgs.br

¹ Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), Faculdade de Farmácia, Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Av. Ipiranga, 2752, Porto Alegre 90610-000, Rio Grande do Sul, Brazil

² Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), Centro de Biotecnologia do Estado do Rio Grande do Sul, Laboratório de Biofilmes e Diversidade Microbiana, Av. Bento Gonçalves 9500, Porto Alegre 915901-970, Rio Grande do Sul, Brazil

³ Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA), Unidade de Microbiologia e Biologia Molecular – Serviço de Patologia Clínica, Porto Alegre 90035-903, Rio Grande do Sul, Brazil

*Corresponding author. Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), Faculdade de Farmácia, Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Av. Ipiranga, 2752, Porto Alegre 90610-000, Rio Grande do Sul, Brazil

Abstract

Background

To investigate the traditional use of medicinal plants for treatment of infectious disease by an indigenous Mbyá-Guarani tribe from South Brazil, evaluating the antibiotic and antibiofilm activities against relevant bacterial pathogens.

Materials and methods

Aqueous extracts from 10 medicinal plants were prepared according to indigenous Mbyá-Guarani traditional uses. To evaluate antibiotic (OD₆₀₀) and antibiofilm (crystal violet method) activities, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, *Staphylococcus epidermidis* ATCC 35984 and seven multi-drug resistant *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase (KPC)-producing bacterial clinical isolates were challenged with the extracts. Furthermore, the susceptibility profile of KPC-producing bacteria and the ability of these isolates to form biofilm were evaluated.

Results

The plants *Campomanesia xanthocarpa*, *Maytenus ilicifolia*, *Bidens pilosa* and *Verbena* sp. showed the best activity against bacterial growth and biofilm formation. The majority of KPC-producing isolates, which showed strong ability to form biofilm and a multidrug resistance profile, was inhibited by more than 50% by some extracts. The *Enterobacter cloacae* (KPC 05) clinical isolate was the only isolate resistant to all extracts.

Conclusions

This study confirms the importance of the indigenous traditional medicinal knowledge and describes for the first time ability of these plants to inhibit biofilm formation and/or planktonic bacterial growth of multi-drug resistant KPC-producing isolates.

Keywords

Mbyá-Guarani ethnic group, Medicinal plants, KPC-producing isolates, Bacterial biofilm

Background

Finding healing powers of plants is an ancient practice, and doubtless the native indian populations are the guardians of biodiversity information and knowledge about how to extract natural resources from native plants [1,2,3]. It is unquestionable that a deep understanding of medicinally useful plants, based on traditional use, is kept by indigenous healers, which have for long used ecologically sustainable holistic medicinal drugs [1,4]. Therefore, indigenous knowledge, transmitted from generation to generation over centuries, becomes important in the context of developing novel pharmaceuticals [5,6].

Indigenous people that remain in their traditional territory and who therefore hold considerable ethnopharmacological knowledge are recognized as a key resource for bioprospection of new drugs, new drug leads, and new chemical entities [5,7,8]. Few groups have such vast knowledge on the chemical properties of plants as the South American indigenous populations [9]. In fact, medicinal plants have formed the basis of sophisticated traditional medicine systems, as developed by the Mbyá-Guarani ethnic group along centuries [6,10]. Today, the Guarani is one of the largest indigenous group in Brazil (approximately 34,000 individuals), formed by three major tribes *Kayová*, *Nhandeva* and *Mbyá* [11]. In addition, ethnopharmacological surveys provide the rationale for selection and scientific investigation of medicinal plants, since some of these indigenous remedies have successfully been used by significant numbers of people throughout recent history [12]. Due to the emergence of multiple drug resistant isolates, scientists have devoted considerable efforts to study plants, since they contain a wide variety of secondary metabolites with antimicrobial action [1].

Since the introduction of antibiotics, bacteria have developed sophisticated resistance strategies. This resistance can be acquired in several ways, including the ability to form biofilm and the production of enzymes capable to inactivate antibiotics. Bacteria in the biofilm mode of growth are between 10 to 1,000 times less susceptible to antimicrobial agents and host immune response, contributing to the chronic character of infections [13]. In addition, the global spread of carbapenemase-producing Enterobacteriaceae represents a real threat to vulnerable hospitalized patients [14]. The carbapenemases most frequently found in this bacterial family are the *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase (KPC) [15]. These β -

lactamases are able to hydrolyze all β -lactamic antibiotics, including carbapenems. In addition, they also can confer resistance to other drugs, such as aminoglycosides and quinolones, promoting a scenario in which less therapeutic options are available for treatment [16]. KPC-producing bacteria have spread worldwide, and currently these microorganisms represent a serious public health problem, since they have been held responsible for several disease outbreaks in different countries [15,16,17,18]. Consequently, investigating compounds with novel mechanisms of action is required to combat the growing health threat from pathogenic bacteria that have developed resistance to current drug classes.

The purpose of the present study was to investigate the antibiotic and antibiofilm potential of plants traditionally used by Mbyá-Guarani, an indigenous tribe from South Brazil against KPC-producing isolates and biofilm-forming bacteria.

Methods

Plant material

The plants were collected from indigenous tribe Mbyá-Guarani living in Lomba do Pinheiro, Porto Alegre, RS, Brazil (30°06'47.62" S and 51°07'37.85" W), in March 2011. Twenty Mbyá-Guarani families live in this village, named *Tekoá Anhetenguá* (in English, *True Village*) and that covers an area of 10 hectares [19]. The older women of the tribe collect plants, traditionally used to treat infectious diseases such as influenza, cough, urination pain, toothache, diarrhea, among others. Voucher specimens were deposited at the herbarium of the Universidade Federal do Rio Grande do Sul (ICN) (see Table 1). The project was approved by the Chieftain, by the Ethical Committee of the Universidade Federal do Rio Grande do Sul, under number 21723 and by the regional office the National Indian Foundation (FUNAI).

Preparation of plant extracts

The fresh plants extracts were prepared by decoction with distilled water at 60 °C for 60 min, the same method used in folk medicine as practiced by the Mbyá-Guarani population. Aqueous extracts were freeze-dried and a 10 mg/mL stock solution was prepared, filtered through a 0.2 μ m pore membrane and stored at -20 °C until use.

Bacterial strains

Pseudomonas aeruginosa ATCC 27853 (Gram negative) and *Staphylococcus epidermidis* ATCC 35984 (Gram positive) were used as models that form biofilm. We also evaluated seven KPC-producing multidrug resistant clinical isolates recovered from a hospital located in Porto Alegre city (Table 2). The identification of these isolates was initially performed by conventional biochemical methodology, and was subsequently confirmed using the automated system VITEK 2 (bioMérieux, UK). The susceptibility profile was constructed according to standard methods (CLSI, 2011). The characterization of KPC-producers included phenotypic (Modified Hodge Test and combined-disks test with boronic acid) and genotypic assays. The polymerase chain reaction (PCR) to detect the KPC gene was performed using previously described primers and reaction conditions [20].

Bacterial suspension

Bacterial strains were grown in Mueller Hinton agar (Oxoid Ltd., England) for 24 h at 37 °C. A bacterial suspension was prepared in 0.9% NaCl, corresponding to 1 McFarland scale (3×10^8 CFU/mL) and used in all assays.

Biofilm formation and antibiofilm formation assay

Biofilm formation capacity of the KPC-producing isolates was assessed according to Antunes et al. (2011) with minor modifications. A volume of 80 μ L of the bacterial suspension was added to each well of a sterile 96-well polystyrene flat-bottom microtitre plate (Costar 3599, Corning, NY, USA). Next, wells were filled with 80 μ L of water and 40 μ L of trypticase soy broth (TSB) medium (Oxoid Ltd., England). The plates were then incubated for 24 h at 37 °C. To remove non-adherent cells, the wells were rinsed three times with sterile saline. The attached bacteria were heat-fixed at 60 °C for 1 h. Crystal violet (0.4%) was used to stain the bacteria for 15 min. The biofilm was eluted with 99.5% DMSO (Sigma–Aldrich Co., USA) and absorbance was measured at 570 nm (Spectramax M2e Multimode Microplate Reader, Molecular Devices, USA). In accordance with the criteria defined by Stepanović et al. (2007), the isolates were classified as non-biofilm producer, weak biofilm producer, moderate biofilm producer and strong biofilm producer [21,22].

The antibiofilm assay was performed as described by Trentin et al. (2011). A bacterial suspension was added in each well, followed by the aqueous extract (0.4 mg/mL or 4.0 mg/mL) and TSB. The plates were incubated for 24 h at 37 °C. The following steps (washing, fixation, and staining) were performed as described above in the biofilm formation assay. The positive control of biofilm formation consisted of 80 µL of the bacterial growth, 40 µL of TSB and 80 µL of water. Values higher than 100% represent a stimulation of biofilm formation, in comparison to the control.

Antibiotic assay

Planktonic bacterial growth was evaluated based on the difference between initial (t = 0) and final (t = 24 h) absorbance at 600 nm in the microtitre plate. In the positive control, the extracts were replaced by 80 µL of water (100% of planktonic bacterial growth). Values higher than 100% represent a stimulation of bacterial growth, in comparison to the control. Rifampicin 8 µg/mL (Sigma–Aldrich Co., USA) was used as a control for the inhibition of bacterial growth of *S. epidermidis*. Gentamicin 20 µg/mL was used as control for *P. aeruginosa* and KPC-producing isolates.

Results and Discussion

In the present study, the antibiotic and antibiofilm activities from 10 medicinal plants were assessed. The choice of plant species was based on ethnopharmacological information used by Mbyá-Guarani natives, from the *Tekoá Anhetenguá* tribe, Porto Alegre, RS, Brazil, to treat infectious diseases (Table 1). KPC-producing isolates are an emergent group of bacteria presenting high resistance to various drugs and that causes infections with high morbidity and mortality rates [24]. The KPC isolates were previously evaluated against the most important classes of antimicrobials (aminoglycoside, carbapenem, cephalosporin and quinolone), demonstrating a multidrug resistance profile (Table 2). Furthermore, the majority of these isolates showed a strong capacity to form biofilm (Table 2). This characteristic increases the pathogenicity of isolates, since biofilms constitute a protected mode of growth and their inherent resistance to antimicrobial agents is usually the cause of many chronic bacterial infections [25,26].

P. aeruginosa is an opportunistic pathogen that causes disease in immunocompromised individuals. *S. epidermidis* is the leading etiologic agent in infections associated with medical implants. *P. aeruginosa* and *S. epidermidis* are difficult to eradicate, and cause persistent infections mainly due to their ability to form biofilms [25].

In this context, the present study is the first report describing the use of these medicinal plants against biofilm formation. The effect of aqueous extracts, at 4.0 and 0.4 mg/mL, on biofilm formation and bacterial growth of all isolates is summarized in Table 3. Additionally, the antibiotic activity against *P. aeruginosa* and KPC-producing isolates has likewise not been previously described.

The aqueous extract of leaves from *Campomanesia xanthocarpa* showed the greatest effect against the bacterial strains. When used as a 4.0 mg/mL solution, the extract reduced biofilm formation by *S. epidermidis* (15.4%), KPC 58 (21.3%), KPC 10 (39.3%), KPC 118 (41%) and *P. aeruginosa* (50%) to lower levels. At this concentration, planktonic bacterial growth was also affected. Bacterial growth inhibition was observed against KPC 10, KPC 58, *P. aeruginosa* and *S. epidermis*, with growth rates of 0, 21.3, 28.1, and 48.8%, respectively. In turn, *C. xanthocarpa* 0.4 mg/mL led to low bacterial growth of *P. aeruginosa* (48.2%) and KPC 182 (54.8%). Leaves of *C. xanthocarpa* are traditionally used to treat stomach problems, diarrhea, and to decrease the blood cholesterol. Ktafke et al. (2010) have reported that leaves of *C. xanthocarpa* reduced total cholesterol and LDL levels in the blood of hypercholesterolemic patients. Besides, the antidiarrheal activity of this plant's fruit has been described [27], as well as its antiulcerogenic effect [28] and ability to lower blood glucose levels [29].

The 4.0 mg/mL extract of *Maytenus ilicifolia* stems allowed a biofilm formation rate of 49.2% by *Enterobacter cloacae* (KPC 58). At this concentration, the planktonic bacterial growth was reduced to 0% for KPC 10, 18.5% for KPC 58, 30.7% for KPC 118 and 38% for KPC 177. When the extract concentration used was 0.4 mg/mL, KPC 177 was able to form only 56.3% of biofilm, while the bacterial growth for KPC 182, KPC 177, KPC 174 and KPC 118 was of 32.4%, 39.3%, 51.1% and 55%, respectively. We observed an intriguing case when the effect of the extract from *M. ilicifolia* was analyzed against KPC 10. This extract completely inhibited the growth of this bacterium, but biofilm formation was not affected (92.6%). There

are two reasonable explanations for these phenomena: (i) the isolate possess an extremely fast ability to form biofilm in the first hours of the assay, but after 24 h the extract kills the planktonic bacteria, leading to staining of dead adhered cells on the polystyrene plate (as assessed by the crystal violet method). The rationale of this method, widely used for the quantification of biofilm, is based on measurement of the total biomass of biofilm with no distinction between live and dead cells;(ii) the action of antibiotics may cause stress to the bacterial cells, stimulating them towards biofilm formation as a self-protection strategy against the hostile environment (Linares et al., 2006). Additionally, these diverse profiles of resistance of clinical isolates and the rise of multidrug-resistant pathogens place emphasis on the significant challenge hospitals currently face, reinforcing the importance of studies to find molecules and the urgent need for novel treatments. The *M. ilicifolia* leaves infusion is commonly used against gastric disorders in Brazil [30]. The triterpenes present in the leaves of this plant have been reported as promising alternatives with anti-inflammatory and antiulcerogenic activity [31]. Interestingly, the indigenous Mbyá-Guarani from *Tekoá Anhetenguá* resort to infusion of stems to treat urination pain and menstrual cramps, as opposed to the traditional use of leaves.

The 4.0 mg/mL extract prepared with aerial parts of *Bidens pilosa* presented the following values of biofilm formation: 20.5% for KPC 10, 35.7% for KPC 58, 43.1% for KPC 118 and 47.2% for *S. epidermidis*. The antibiotic activity of this extract became evident in the light of the low levels of bacterial growth observed in KPC 58 (16.1%), KPC 10 (30.4%) and *S. epidermidis* (27%). Biological activities of *B. pilosa* have also been investigated. The aqueous extract of this plant presented potent antimicrobial activity against *S. epidermidis*, *Bacillus cereus* and *Serratia marcescens* [32]. Similarly, the methanolic extract of this same plant was effective in inhibiting the growth of *Staphylococcus aureus* and *B. cereus* [33].

Isolates KPC 118 and *S. epidermidis*, respectively, exhibited biofilm formation of 36.3% and 49.4%, when exposed to *Verbena* sp. extract 4.0 mg/mL. This extract, at the same concentration, allowed the bacterial growth of 22.6% and 42.5% of isolates KPC 10 and KPC 58, respectively. Hernández et al. (2000) reports that the flavonoids in methanolic extract of *Verbena officinalis* exert antibiotic activity against *Escherichia coli*, *S. aureus* and *Bacillus subtilis* [34].

The bacterial growth of *S. epidermidis* was completely inhibited by *Trichilia* sp. root extract 4.0 mg/mL; furthermore, this extract allowed biofilm formation of only 14.9% for this isolate. Regarding isolate KPC 118, two extracts inhibited biofilm formation: leaves of *Coix lacrymajobi* and *Citrus limonium* allowing just 39.8% and 49.7% of biofilm formation, respectively.

Conclusions

Considering the high percentage of medicinal plants active against highly drug-resistant clinical strains and traditionally used by the Mbyá natives, it is possible to hypothesize that traditional medicine worldwide can provide a number of active compounds. Interestingly, the active extracts presented no specificity for Gram-positive or Gram-negative strains, which may be considered an advantage in the research and development of new therapies. Moreover, this tallies with the highly diverse traditional uses by Mbyá-Guarani people. These results unveil the importance of conservation of cultural aspects in these native communities, and represent a good basis for funding strategies to preserve forests in indian areas. This study highlighted the efficacy of antibiotic and antibiofilm activities of medicinal plants used to treat infectious diseases and, more importantly, the activity against multi-drug resistant bacterial strains.

Competing interests

The authors declare that there are no competing interests involved in this study.

Authors' contributions

CLCB carried out field research and performed the bacteriological analyses. KRZ supported the extract preparation and bacteriological analysis and draft the manuscript. AJM and TT conceived and designed the study revised the manuscript and supported financially the study. VBR and ALB isolated, performed MIC assays and maintain the KPC strains. All authors have participated in the design of the study, and in the analysis and interpretation of data. All authors contributed to and approved the final Manuscript.

Acknowledgements

The authors acknowledge the fellowship of NANOBIOTEC-Brazil program from CAPES and FAPERGS, and are grateful to Chieftain José Cirilo Pires Morinico (tribe *Tekoá Anhetenguá*),

for allowing us to work with the Mbyá-Guarani population and for precious information he provided.

References

1. Cowan MM: **Plant products as antimicrobial agents.** *Clin Microbiol Rev* 1999, **12**:564-582.
2. Stephens C, Porter J, Nettleton C, Willis R: **Disappearing, displaced, and undervalued: a call to action for Indigenous health worldwide.** *Lancet* 2006, **367**:2019-2028.
3. Rego FLH, Brand AJ, da Costa RB: **Recursos genéticos, biodiversidade, conhecimento tradicional Kaiowá e Guarani e o desenvolvimento local.** *Interações* 2010, **11**:55-69.
4. Elisabetsky E, Shanley P: **Ethnopharmacology in the Brazilian Amazon.** *Pharmacol Ther* 1994, **64**:201-214.
5. Rao SS: **Indigenous knowledge organization: An Indian scenario.** *Int J Inf Manage* 2006, **26**:224–233.
6. Brandelli CLC, Giordani RB, Macedo AJ, De Carli GA, Tasca T: **Indigenous Traditional Medicine: Plants for the Treatment of Diarrhea.** In *Nature Helps... How Plants and Other Organisms Contribute to Solve Health Problems. Volume 1.* 1st edition. Edited by Mehlhorn, Berlin: H. Springer-Verlag; 2011:1-18.
7. Balunas MJ, Kinghorn AD: **Drug discovery from medicinal plants.** *Life Sci* 2005, **78**:431-441.
8. Uprety Y, Asselin H, Boon EK, Yadav S, Shrestha KK: **Indigenous use and bio-efficacy of medicinal plants in the Rasuwa District, Central Nepal.** *J Ethnobiol Ethnomed* 2010, **6**:3.
9. Bueno NR, Castilho RO, Costa RB, Pott A, Pott VJ, Scheidt GN, Batista MS: **Medicinal plants used by the Kaiowá and Guarani indigenous populations in the Caarapó Reserve, Mato Grosso do Sul, Brazil.** *Acta Bot Bras* 2005, **19**:39-44.

10. Crivos M, Martínez MR, Pochettino ML, Remorini C, Sy A, Teves L: **Pathways as "signatures in landscape": towards an ethnography of mobility among the Mbya-Guaraní (Northeastern Argentina).** *J Ethnobiol Ethnomed* 2007, **3**: 2.
11. **Fundação Nacional do Índio** [<http://www.funai.gov.br>]
12. Weldegerima B: **Review on the importance of documenting ethnopharmacological information on medicinal plants.** *J Pharm Pharmacol* 2009, **3**:400-403.
13. Stewart PS, Costerton JW: **Antibiotic resistance of bacteria in biofilms.** *Lancet* 2001, **358**:135-138.
14. Won SY, Munoz-Price LS, Lolans K, Hota B, Weinstein RA, Hayden MK, Centers for Disease Control and Prevention Epicenter Program: **Emergence and rapid regional spread of *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase-producing Enterobacteriaceae.** *Clin Infect Dis* 2011, **53**:532-540.
15. Nordmann P, Cuzon G, Naas T: **The real threat of *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase-producing bacteria.** *Lancet Infect Dis* 2009, **9**:228-236.
16. Hirsch EB, Tam VH: **Detection and treatment options for *Klebsiella pneumoniae* carbapenemases (KPCs): an emerging cause of multidrug-resistant infection.** *J Antimicrob Chem* 2010, **65**:1119-1125.
17. Andrade LN, Curiao T, Ferreira JC, Longo JM, Clímaco EC, Martinez R, Bellissimo-Rodrigues F, Basile-Filho A, Evaristo MA, Del Peloso PF, Ribeiro VB, Barth AL, Paula MC, Baquero F, Cantón R, Darini AL, Coque TM: **Dissemination of blaKPC-2 by the spread of *Klebsiella pneumoniae* clonal complex 258 clones (ST258, ST11, ST437) and plasmids (IncFII, IncN, IncL/M) among Enterobacteriaceae species in Brazil.** *Antimicrob Agents Chemother* 2011, **55**:3579-3583.

18. Woodford N, Turton JF, Livermore DM: **Multiresistant Gram-negative bacteria: the role of high-risk clones in the dissemination of antibiotic resistance.** *FEMS Microbiol Lett* 2011, **35**:36-55.
19. Souza JOC, Moraes CEN, Pires DM, Morinico JCP, Arnt MA: *Tava Miri São Miguel Arcanjo, Sagrada Aldeia de Pedra: os Mbyá-Guarani nas Missões.* Porto Alegre: 12°SR – IPHAN; 2007.
20. Yigit H, Queenan AM, Anderson GJ, Domenech-Sanchez A, Biddle JW, Steward CD, Alberti S, Bush K, Tenover FC: **Novel carbapenem-hydrolyzing beta-lactamase, KPC-1, from a carbapenem-resistant strain of *Klebsiella pneumoniae*.** *Antimicrob Agents Chemother* 2001, **45**:1151-1161.
21. Antunes AL, Bonfanti JW, Perez LR, Pinto CC, Freitas AL, Macedo AJ, Barth AL: **High vancomycin resistance among biofilms produced by *Staphylococcus* species isolated from central venous catheters.** *Mem Inst Oswaldo Cruz* 2011, **106**:51-55.
22. Stepanović S, Vuković D, Hola V, Di Bonaventura G, Djukić S, Cirković I, Ruzicka F: **Quantification of biofilm in microtiter plates: overview of testing conditions and practical recommendations for assessment of biofilm production by staphylococci.** *APMIS* 2007, **115**:891-899.
23. Trentin DD, Giordani RB, Zimmer KR, da Silva AG, da Silva MV, Correia MT, Baumvol IJ, Macedo AJ: **Potential of medicinal plants from the Brazilian semi-arid region (Caatinga) against *Staphylococcus epidermidis* planktonic and biofilm lifestyles.** *J Ethnopharmacol* 2011, **137**:327-335.
24. Arnold RS, Thom KA, Sharma S, Phillips M, Kristie Johnson J, Morgan DJ: **Emergence of *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase-producing bacteria.** *South Med J* 2011, **104**:40-45.
25. Costerton JW, Stewart PS, Greenberg EP: **Bacterial Biofilms: A Common Cause of Persistent Infections.** *Science* 1999, **284**:1318-1322.

26. Davies D: **Understanding biofilm resistance to antimicrobial agents.** *Nat Rev Drug Discov* 2003, **2**:114-122.
27. Souza-Moreira TM, Salvagnini LE, Santos E, Silva VYA, Moreira RRD, Salgado HRN, Pietro RCLR: **Antidiarrheal activity of *Campomanesia xanthocarpa* fruit.** *J Med Food* 2011, **14**: 528–531.
28. Markman BE, Bacchi EM, Kato ET: **Antiulcerogenic effects of *Campomanesia xanthocarpa*.** *J Ethnopharmacol* 2004, **94**:55-57.
29. Vinagre AS, Ronnau A, Pereira SF, da Silveira LU, Wiilland ED, Suyenaga ES: **Anti-diabetic effects of *Campomanesia xanthocarpa* (Berg) leaf decoction.** *J Pharm Sci* 2010, **46**:169–177.
30. Rattmann YD, Cipriani TR, Sasaki GL, Iacomini M, Rieck L, Marques MC, da Silva-Santos JE: **Nitric oxide-dependent vasorelaxation induced by extractive solutions and fractions of *Maytenus ilicifolia* Mart ex Rissek (Celastraceae) leaves.** *J Ethnopharmacol* 2006, **104**:328-335.
31. Jorge RM, Leite JP, Oliveira AB, Tagliati CA: **Evaluation of antinociceptive, anti-inflammatory and antiulcerogenic activities of *Maytenus ilicifolia*.** *J Ethnopharmacol* 2004, **94**:93-100.
32. Adedapo A, Jimoh F, Afolayan A: **Comparison of the nutritive value and biological activities of the acetone, methanol and water extracts of the leaves of *Bidens pilosa* and *Chenopodium album*.** *Acta Pol Pharm* 2011, **68**:83-92.
33. Rabe T, van Staden J: **Antibacterial activity of South African plants used for medicinal purposes.** *J Ethnopharmacol* 1997, **56**:81-87.

34. Hernández NE, Tereschuk ML, Abdala LR: **Antimicrobial activity of flavonoids in medicinal plants from Tafí del Valle (Tucumán, Argentina).** *J Ethnopharmacol* 2000, **73**:317-322.

Table 1 Medicinal plants routinely used by indigenous Mbyá-Guarani (Located in Lomba do Pinheiro, Porto Alegre, RS, Brazil, from *Tekoá Anhetenguá*), for treatment of infectious diseases.

Family	Scientific Name (Voucher)	Name in Guarani or Mbyá-Guarani	Popular name	Plant parts	Mbyá-Guarani uses
Asphodelaceae	<i>Aloe arborescens</i> Mill. (ICN 173371)	Karaguatane	Babosa	Leaves	Burns
Asteraceae	<i>Bidens pilosa</i> L. (ICN 167397)	Ñuati una	Picão preto	Aerial parts	Menstrual disorders
Cactaceae	<i>Rhipsalis baccifera</i> (ICN 167402)	-	-	Aerial parts	Wounds
Celastraceae	<i>Maytenus ilicifolia</i> Mart ex. Reissek (ICN 167402)	Yvyra rapo ju/Aka	Espinheira-santa	Stem	Menstrual cramps/ Urination pain
Meliaceae	<i>Trichilia</i> sp. (ICN 173126)	Ka'avove'i	-	Roots	Toothache
Myrtaceae	<i>Campomanesia xanthocarpa</i> O. Berg (ICN 167401)	Guavira	Guabiroba	Leaves	Diarrhea/ Worms/ Stomach ache
Poaceae	<i>Coix lacryma-jobi</i> L. (ICN 167396)	-	Lágrima de Nossa Senhora	Leaves	Urination pain
Rutaceae	<i>Citrus limonium</i> (ICN 167399)	-	Limão	Leaves	Flu/ Cough
Rutaceae	<i>Citrus reticulata</i> (ICN 167399)	Narã pe'i	Bergamota	Leaves	Vomit
Verbenaceae	<i>Verbena</i> sp. (ICN 167394)	Guachu ka'a	Verbena	Aerial parts	Fever

Table 2 Profile of KPC-producing isolates and their respective profile of biofilm formation category and susceptibility to antibiotics

Isolate number	Identification	Source	Biofilm category	Minimal inhibitory concentration (µg/mL) ^{a,b}						
				ERT	IMP	MEM	AK	CAZ	CIP	FEP
KPC 05	<i>Enterobacter cloacae</i>	Catheter	Strong	> 512 (R)	128 (R)	32 (R)	64 (R)	128 (R)	256 (R)	128 (R)
KPC 10	<i>Enterobacter cloacae</i>	Urine	Strong	> 512 (R)	512 (R)	> 64 (R)	128 (R)	> 256 (R)	> 256 (R)	256 (R)
KPC 58	<i>Enterobacter cloacae</i>	Hemoculture	Strong	> 512 (R)	128 (R)	64 (R)	16 (S)	16 (R)	128 (R)	256 (R)
KPC 118	<i>Enterobacter cloacae</i>	Urine	Weak	32 (R)	16 (R)	> 64 (R)	64 (R)	32 (R)	32 (R)	256 (R)
KPC 174	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	Secretion	Moderate	16 (R)	128 (R)	64 (R)	256 (R)	128 (R)	128 (R)	64 (R)
KPC 177	<i>Serratia marcescens</i>	Urine	Strong	32 (R)	8 (R)	64 (R)	16 (S)	8 (I)	16 (R)	4 (S)
KPC 182	<i>Enterobacter cloacae</i>	Urine	Strong	2 (R)	16 (R)	64 (R)	4 (S)	4 (S)	16 (R)	> 256 (R)

^a MICs were determined using micro broth dilution method (CLSI)

^b Ertapenem (ERT); imipenem (IMP); meropenem (MEM); amikacin (AK); ceftazidime (CAZ); ciprofloxacin (CIP); cefepime (FEP).

Resistant (R); intermediate (I), sensitive (S)

Table 3 Biofilm formation and bacterial growth effect of 10 medicinal plants used for infectious disease treatment by Mbyá-Guarani Indians. All results are presented in %.

Bacterial strain		<i>Aloe arborescens</i>	<i>Bidens pilosa</i>	<i>Rhipsalis baccifera</i>	<i>Maytenus ilicifolia</i>	<i>Trichilia sp.</i>	<i>Campomanesia xanthocarpa</i>	<i>Coix lacryma-jobi</i>	<i>Citrus limonium</i>	<i>Citrus reticulata</i>	<i>Verbena sp.</i>
<i>Enterobacter cloacae</i> (KPC 05)	BF (4.0)	142.9±7.5	113.7±4.5	140.2±8.8	78.1±4.8	131.7±1.3	95.8±14.4	133.6±2.3	130.6±5.3	129.9±9.7	132.7±3.1
	BG (4.0)	121.9±11.0	117.3±21.2	143.3±18.4	97.1±19.5	135.1±7.3	69.7±22.2	123.9±5.4	131.7±1.1	112.6±9.5	124.9±9.5
	BF (0.4)	115.74±3.2	104.8±0.04	106.6±0.9	116.9±6.5	122.7±1.1	139.2±9.6	115.8±9.2	95.9±9.2	121.2±0.6	90.7±3.6
	BG (0.4)	95.2±7.2	102.7±0.2	135.9±11.4	100.2±8.8	104.0±6.0	77.4±4.6	102.3±1.5	99.1±2.8	100.1±1.3	101.4±2.1
<i>Enterobacter cloacae</i> (KPC 10)	BF (4.0)	284.6±1.7	20.5±0.4	268.8±2.7	92.6±0.9	215.8±6.2	39.3±1.7	206.3±6.3	228.3±2.2	274.6±14.8	95.9±0.1
	BG (4.0)	136.2±3.7	30.4±2.0	165.5±6.0	0±1.03	138.2±5.1	0±22.8	109.7±8.9	113.8±17.0	179.8±1.7	22.6±2.4
	BF (0.4)	148.1±0.5	185.1±9.4	217.3±17.7	233.9±9.6	165.7±13.7	285.5±6.6	175.4±2.6	148.6±10.7	140.5±0.3	140.9±0.2
	BG (0.4)	103.7±0.1	80.9±4.5	109.8±4.6	99.2±7.6	102.1±3.7	63.1±1.3	100.4±3.4	103.4±3.0	103.9±2.5	94.2±0.8
<i>Enterobacter cloacae</i> (KPC 58)	BF (4.0)	134.9±6.0	35.7±16.0	131.0±1.2	49.2±7.8	125.4±1.2	21.3±2.7	97.8±6.4	108.7±6.7	130.9±0.7	113.8±14.6
	BG (4.0)	181.3±14.3	16.1±1.4	175.1±2.0	18.5±4.0	220.8±28.7	21.3±2.0	205.3±48.3	203.9±42.1	209.3±23.5	42.5±3.8
	BF (0.4)	108.2±3.9	121.3±0.9	128.7±2.6	120.2±3.3	104.2±2.7	108.7±8.2	108.3±9.0	107.4±3.9	103.2±2.7	102.1±0.3
	BG (0.4)	116.6±8.0	85.4±30.0	141.5±1.6	95.9±2.9	120.8±5.4	86.7±7.6	121.1±1.4	120.7±0.8	118.5±8.3	105.0±6.7
<i>Enterobacter cloacae</i> (KPC 118)	BF (4.0)	155.4±14.0	43.1±4.7	75.5±7.0	81.2±3.3	136.8±24.1	41.0±14.7	39.8±0.9	49.7±9.3	167.2±24.0	36.3±2.1
	BG (4.0)	137.9±3.1	67.8±2.7	141.3±8.4	30.7±23.8	164.8±18.3	99.6±6.2	120.4±8.3	124.1±6.1	136.7±7.6	114.3±3.3
	BF (0.4)	94.5±3.0	89.3±0.7	110.6±27.7	62.3±11.9	88.2±16.3	74.2±23.5	80.0±12.1	91.8±4.6	95.6±0.5	83.3±15.1
	BG (0.4)	99.7±0.7	96.6±4.3	124.5±8.1	55.0±24.4	100.5±0.4	74.0±20.2	100.3±5.1	104.6±0.04	98.0±1.0	98.6±0.08
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	BF (4.0)	331.4±17.7	119.3±5.5	206.3±12.7	171.7±14.4	188.3±9.0	154.8±58.7	125.3±49.9	187.4±7.5	398.0±17.89	119.8±29.4
	BG (4.0)	147.6±0.3	86.1±2.4	136.6±0.3	163.7±22.3	142.1±2.1	70.3±0.03	141.3±2.1	148.5±2.9	149.0±1.7	121.5±0.7

(KPC 174)	BF (0.4)	109.8±0.6	150.9±22.5	129.0±2.5	97.0±12.6	137.4±4.9	134.2±11.1	120.6±2.1	156.5±8.9	139.5±22.6	130.2±0.1
	BG (0.4)	113.9±4.8	98.9±5.0	107.8±2.8	51.1±10.5	111.0±6.0	113.9±0.4	106.4±2.8	97.9±1.3	109.0±3.0	99.3±4
<i>Serratia marcescens</i>	BF (4.0)	126.0±3.5	158.9±10.2	161.2±14.8	101.5±4.2	164.8±10.4	176.2±10.7	139.9±5.9	103.1±0.2	144.5±20.7	147.5±11.9
	BG (4.0)	167.0±2.7	122.9±2.2	124.4±1.2	38.0±9.8	136.4±2.5	80.5±2.9	134.7±0.6	147.5±1.6	139.4±1.7	113.2±7.8
(KPC 177)	BF (0.4)	82.3±2.7	98.6±2.8	106.5±10.4	56.3±1.5	97.0±0.1	148.0±15.7	116.4±2.6	84.1±0.5	116.5±7.9	110.8±9.1
	BG (0.4)	103.1±4.4	92.0±1.3	101.9±2.7	39.3±1.0	102.4±1.3	80.9±0.1	96.5±2.9	103.2±1.0	99.8±2.9	96.8±0.7
<i>Enterobacter cloacae</i>	BF (4.0)	190.9±24.9	120.2±14.5	188.6±2.6	137.4±11.3	130.2±4.1	75.7±5.7	134.3±12.0	206.5±2.9	195.3±11.7	165.2±4.5
	BG (4.0)	181.1±0.7	146.0±4.7	164.6±1.7	74.7±7.2	131.6±10.1	74.0±7.7	176.3±5.6	157.8±10.7	168.6±3.2	124.9±2.9
(KPC 182)	BF (0.4)	116.2±11.9	120.1±7.5	115.9±19.3	216.8±2.7	104.0±5.2	116.1±15.6	127.4±5.8	170.1±9.6	113.0±15.8	110.3±8.3
	BG (0.4)	120.4±0.2	104.1±0.1	117.0±7.6	32.4±24.6	106.1±8.1	54.8±5.3	112.8±0.6	112.2±1.2	111.8±0.4	102.1±0.1
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	BF (4.0)	147.0±8.7	94.0±2.2	116.6±18.8	69.1±5.0	106.0±2.0	50.0±0.02	140.8±2.6	107.6±9.9	127.6±0.5	105.0±3.1
	BG (4.0)	154.0±2.7	111.2±0.01	89.4±19.0	78.5±3.0	119.6±0.6	28.1±2.6	103.8±2.2	1384±10.8	146.9±3.7	110.8±0.2
ATCC 27853	BF (0.4)	107.4±7.7	95.5±17.1	137.7±8.8	125.8±9.0	106.3±13.8	139.3±0.3	95.2±3.1	101.4±16.1	87.3±1.8	109.1±3.3
	BG (0.4)	113.5±0.5	103.0±1.1	109.9±8.3	71.6±8.0	98.3±1.2	48.2±4.6	103.6±3.0	115.1±0.2	104.8±5.5	102.1±3.6
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	BF (4.0)	199.3±18.6	47.2±0.8	160.4±23.3	102.0±11.5	14.9±1.4	15.4±0.9	198.4±13.4	139.7±8.6	164.4±5.7	49.4±7.0
	BG (4.0)	179.2±14.2	27.0±1.4	142.5±9.0	110.8±9.4	0±3.2	48.8±11.1	136.0±1.5	219.1±0.5	122.5±6.8	110.0±8.8
ATCC 35984	BF (0.4)	106.1±7.3	54.7±1.9	107.4±14.2	110.3±5.4	69.6±1.5	204.5±1.0	109.5±1.7	72.2±6.6	92.3±0.9	123.3±1.3
	BG (0.4)	154.8±9.7	107.6±6.7	114.9±4.5	105.7±1.8	154.0±18.1	97.9±17.1	100.8±10.9	92.4±3.0	100.3±2.4	91.0±0.5

Legend: BG: Bacterial Growth; BF: Biofilm Formation. In parentheses is indicated the concentration tested in mg/ml.

III.2. CAPÍTULO 2 – Clara Lia Costa Brandelli, Patrícia de Brum Vieira, Alexandre José Macedo and Tiana Tasca. Remarkable anti-*Trichomonas vaginalis* activity of plants traditionally used by the Mbyá-Guarani indigenous group in Brazil.

Remarkable anti-*Trichomonas vaginalis* activity of plants traditionally used by the Mbyá-Guarani indigenous group in Brazil

Clara Lia Costa Brandelli, Patrícia de Brum Vieira, Alexandre José Macedo and Tiana Tasca*

Faculdade de Farmácia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Av. Ipiranga 2752, 90610.000, Porto Alegre, RS, Brazil.

Clara Lia Costa Brandelli and Patrícia de Brum Vieira contributed equally to this work.

Corresponding author: Tiana Tasca

Adress: Av. Ipiranga 2752, 90610-000, Porto Alegre, RS, Brazil.

Tel.: +55 (51) 3308-5325; Fax: +55 (51) 3308-5437.

E-mail address: tiana.tasca@ufrgs.br

Abstract

Trichomonas vaginalis, a flagellate protozoan, is the causative agent of trichomonosis, the most common non-viral sexually transmitted disease worldwide. Taking into account the increased prevalence of metronidazole-resistant isolates, alternative drugs are essential for the successful treatment. Natural products (secondary metabolites) are the source for most new drugs, and popular wisdom about the use of medicinal plants is a powerful tool in this search. In this study the activity of 10 medicinal plants extensively used in daily life by Mbyá-Guarani indigenous group was evaluated against seven different *T. vaginalis* isolates. Among the aqueous extracts tested, *Verbena* sp. (*Guachu ka'a* in Mbyá-Guarani language) and *Campomanesia xanthocarpa* (*Guavira* in Mbyá-Guarani language) showed the highest activity against *T. vaginalis* with MIC value of 4.0 mg/mL reaching 100% of efficacy against the parasite. The kinetic growth assays showed that the extracts promoted completely growth abolishment after 4 h of incubation. In addition, the extracts tested did not promote a significant hemolytic activity against human erythrocytes. Our results show for the first time the potential activity of *Verbena* sp. and *C. xanthocarpa* against *T. vaginalis*. In addition, this study demonstrates that indigenous knowledge is an important source of new prototype antiprotozoal agents.

Keywords: *Trichomonas vaginalis*, medicinal plants, Mbyá-Guarani, ethnopharmacology

Introduction

Trichomonas vaginalis parasitizes the urogenital human tract causing trichomonosis, the most prevalent non-viral sexually transmitted disease worldwide, being responsible for 174 million new cases annually (WHO 2001). After colonization, the parasite causes vaginitis, urethritis, and prostatitis (Petrin et al. 1998). Moreover, the pathogen has been associated with serious consequences as adverse pregnancy outcomes and preterm birth (Klebanoff et al. 2001), infertility (Grodstein et al. 1993), predisposition to cervical cancer (Viikki et al. 2000), and pelvic inflammatory disease (Cherpes et al. 2006). Trichomonosis also acts as a cofactor in human immunodeficiency virus (HIV) transmission and acquisition (Sorvillo et al. 2001; Van Der Pol et al. 2008). The therapeutic arsenal for trichomonosis is restricting, only metronidazole and tinidazole, both 5-nitroimidazole drugs, are approved by the FDA for trichomonosis treatment (Ali and Nozaki 2007). Although the cure rate is high, treatment failure can be observed, usually related to noncompliance or reinfection. Nevertheless, the resistance of *T. vaginalis* isolates to the chemotherapy is the main reason to treatment failure (Schwebke and Barrientes 2006). In this sense, is undoubtedly necessary the investigation for new alternatives for the treatment of trichomonosis and two strategies can be followed: (i) the search for new therapeutic targets, which is essential to rational development of new antiparasitic agents and (ii) the investigation of new anti-*T. vaginalis* compounds structurally distinct from 5-nitroimidazoles and, consequently, acting by different mechanism as demonstrated by our group (Giordani et al. 2010; 2011).

In this context, natural products, especially medicinal plants, are immeasurable as a potent source of bioactive molecules. Since ancient times, people use plants to treat common infectious diseases and some of these traditional medicines are still integrated as part of the cure of diverse pathologies (Ríos and Recio 2005). The remarkable contribution of plants for the pharmaceutical industry can be explained by the wealth production of secondary metabolites that represent an important source of active biomolecules.

The search by new active compounds is often based on ethnopharmacological information, since rescues of the historical utilization of medicinal plants used by people brings an immense knowledge empirically tested for centuries (Heinrich 2003; Brandelli et al. 2011). Regarding the culturally transferred knowledge of the natural

environment and vast wealth of genetic resources, Brazil is a country of interest to ethnopharmacology (Elisabetsky and Wannmacher 1993). Indigenous people have a wealth of biodiversity information and how to capture and use natural resources (Rego et al. 2010). Despite of several drugs have been discovered through traditional cures and folk knowledge, in Brazil there are 122 indigenous ethnic groups but only 30% of them were investigated with regard to ethnobotanical aspects (Coutinho et al. 2002; Gilani and Atta-ur-Rahman 2005). Therefore, the study of plants used by indigenous medicine is important to interconnect traditional medicine and biotic environment preserving the indigenous ancient knowledge.

Parasitic protozoa remain a major threat to human and animal health and there are few effective drugs for the treatment of many protozoal diseases. Taking into account the indigenous ethnopharmacology as a contributor to the systematic screening of plants with antiprotozoal activity, this study evaluated the anti-*T. vaginalis* activity of the most important medicinal plants used in Mbyá-Guarani indigenous medicine located in South of Brazil.

Materials and methods

Parasite culture conditions

In order to compare the effect of the extracts in different *T. vaginalis* isolates, seven isolates were used in this study: 30236 and 30238 from American Type Culture Collection (ATCC); TV-LACM1, TV-LACM2, and TV-LACM3 (fresh clinical isolates from female patients), TV-LACH1 and TV-LACH2 (fresh clinical isolates from male patients) all from Laboratório de Análises Clínicas e Toxicológicas, Faculdade de Farmácia, UFRGS, Brazil (project with approval by UFRGS Ethical Committee, number 18923). Trichomonads were axenically cultured in trypticase-yeast extract-maltose (TYM) medium (pH 6.0), supplemented with 10% heat-inactivated bovine serum and incubated at 37 °C (Diamond 1957).

Plant material

The plants were collected from indigenous tribe Mbyá-Guarani located at the Lomba do Pinheiro, Porto Alegre, RS, Brazil (30°06'47.62" S and 51°07'37.85" W), in March 2011. This village is denominated *Tekoá Anhetenguá* (in English, *True Village*) and 200 people live in the area gathered at 40 families. The women of the village have

the knowledge of medicinal plants used by the entire population and conducted the collection of specimens. Ten plants routinely used in indigenous medicine for infectious diseases were collected: leaves of *Aloe arborescens* Mill. (ICN 173371), aerial parts of *Bidens pilosa* L. (ICN 167397), aerial parts of *Rhipsalis baccifera* (ICN 167402), barks of *Luehea divaricata* (ICN 167403), roots of *Trichilia* sp. (ICN 173126), leaves of *Campomanesia xanthocarpa* O. Berg. (ICN 167401), leaves of *Coix lacryma-jobi* Lin. (ICN 167396), leaves of *Citrus limonium* (ICN 167399), leaves of *Citrus reticulata* (ICN 173127), and leaves of *Verbena* sp. (ICN 167394). The voucher specimens were deposited at the herbarium of the Universidade Federal do Rio Grande do Sul (ICN).

Preparation of plant extracts

The fresh plants extracts were prepared conforming traditional use by indigenous, by decoction, at 60 °C for 60 min [1:10; (w:v)]. Aqueous extracts were freeze-dried and the work solution was prepared at 8.0 mg/mL in ultrapure water, sterilized by filtration (0.22 µm), and stored at –20 °C.

Anti-*Trichomonas vaginalis* assay

Ten aqueous extracts were screened *in vitro* for activity against *T. vaginalis*. The assay was performed in 96 microtiter plates at final concentration of 4.0 mg/mL in the wells. For the extracts that showed the highest anti-*T. vaginalis* activity the inhibitory minimum concentration (MIC) was determined using an eightfold dilution (4.0 – 0.031 mg/mL). The viability of the trophozoites was determined according to a fluorimetric method (Duarte et al. 2009). Two controls were performed: negative control only with trophozoites and a positive control with 8.0 µM metronidazole (Sigma Chemical Co., Saint Louis, MO, USA). The experiments were performed at least in three independent experiments, in triplicate. The results were expressed as the percentage of viable trophozoites compared to untreated parasites.

Growth effect of aqueous extracts

In order to investigate the effect of the active aqueous extracts on *T. vaginalis* growth, a kinetic growth curve was performed using the ATCC 30236 isolate. The parasites initial density of 2.0×10^5 trophozoites/mL was incubated with the extracts at MIC value in TYM medium. The trophozoites were counted using a hemocytometer

during 72 h. The results were expressed as trophozoite number ($10^5/\text{mL}$). For microscopic analysis, the control and treated parasites were centrifuged for 10 min at 2,000 rpm to concentrate the organisms after 4 h of incubation and the preparation was observed in light microscope (magnified $\times 1,000$) by trypan blue dye exclusion.

Hemolytic assay

This assay was performed according to the method used by Rocha et al. (2012). Blood type O positive from healthy human volunteers was collected with Alsever's solution (1:1) and centrifuged at 2,000 rpm for 5 min. The erythrocyte fraction was washed three times with PBS 1x (pH 7.0) and resuspended to give 1% red cell suspension (v/v). Aqueous extracts concentrations were chosen according to minimum inhibitory concentration (MIC) determined in the susceptibility assay. The erythrocytes were incubated with the extracts at 37 °C under agitation for 1 h and then were centrifuged at 3,000 rpm for 5 min. The absorbance of the supernatant was measured at 540 nm. The experiment was performed in triplicate and the percentage of hemolysis caused by each sample tested was calculated in comparison to 100% hemolytic activity of saponin from *Quillaja saponaria* (Sun et al. 2008).

Results and discussion

This study evaluated the anti-*T. vaginalis* activity of aqueous extracts of 10 medicinal plants used in medicine system Mbyá-Guarani. Among the plants tested, we found two aqueous extracts with a potent anti-*T. vaginalis in vitro* activity. The promising extracts are of *Verbena* sp. and *Campomanesia xanthocarpa*. The extract from *Verbena* sp., at 4.0 mg/mL, demonstrated the optimal anti-*T. vaginalis* activity inducing complete cytotoxicity (100% of parasites death) upon all distinct trichomonads isolates (Fig. 1a). The leaves extract of *Campomanesia xanthocarpa* at the same concentration also showed a very high anti-*T. vaginalis* activity, reducing the parasite viability up to 96% (Fig. 1b).

Other aqueous extract displayed a variety of results. The aqueous extract obtained from *Bidens pilosa* totally abolished the trophozoites viability only of the 30236 isolate (Fig. 1c). The extract of the barks of *Luehea divaricata* induced a reduction of *T. vaginalis* viability differently in each trichomonads isolate tested (Fig. 1d). The leaves of *Coix lacryma-jobi* induced, on average, 75% of viability reduction

on *T. vaginalis* isolates, however, for the TV-LACH2 isolate the reduction was only 40% (Fig. 1e). The fresh clinical isolates from male patients (TV-LACH1 and TV-LACH2) presented higher susceptibility than the isolates from female patients (ATCC and fresh clinical) when the root extract of *Trichilia* sp. was tested (Fig. 1f). Extracts of leaves from *Citrus limonium* reduced about 40% the viability of isolates (Fig. 1g). The extracts from *Aloe arborescens* and *Citrus reticulata* decreased the viability of 50% of at least one isolated (Fig. 1h, 1i), while *Rhipsalis baccifera* reduced only 30% the viability of 30236 and TV-LACM2 isolates (Fig. 1j).

In comparison to the other extracts, the extracts from *Verbena* sp. and *C. xanthocarpa* demonstrated the most promising activity against *T. vaginalis* and the minimum inhibitory concentration was determined for the 30236 isolate (Table 1).

In order to investigate the effect of the most active extract on parasite growth and viability, a kinetic growth curve was constructed. The extracts of *Verbena* sp. and *C. xanthocarpa*, after 4 h of incubation, evoked a complete growth abolishment (Fig. 2). The control exhibited the classical growth peak after 24 h incubation. After 4 hours of treatment with *C. xanthocarpa* (Fig. 3a) and *Verbena* sp. (Fig. 3b) extracts all organisms demonstrated a distinctive blue color by the trypan blue dye exclusion indicating cell death.

Hemolysis assay was conducted to infer a possible effect of the *C. xanthocarpa* and *Verbena* sp. extracts on parasites membrane and also, to have preliminary data on cytotoxicity against mammalian cells. The *Verbena* sp. and *C. xanthocarpa* extracts were tested at MIC values and demonstrated 6.5 and 7.6% erythrocytes lysis, respectively (Table 1). These results demonstrated that both extracts, at MIC values, did not promote a significant hemolytic activity, indicating that the mechanism of action responsible for the cytotoxic effect probably does not involve parasitic membrane disruption. Moreover and importantly, these findings suggest that both extracts are not toxic to mammalian cells, since they did not lyse human erythrocytes.

The infusion of *Verbena officinalis* is drunk as sedative, analgesic, inflammatory disorders, skin burns, amenorrhea, depression, and gastric diseases (Calvo 2006; Lai et al. 2006; Speroni et al. 2007). Moreover, the indigenous Mbyá-Guarani use *Verbena* sp. (*Guachu ka'a* in Mbyá-Guarani language), as infusion, for

relief of symptoms of infectious diseases, such as fever. *C. xanthocarpa* is traditionally used in the South of Brazil as depurative, anti-diarrhoeic, cleanser, anti-rheumatic, and to decrease the blood cholesterol (Biavatti et al. 2004). The leaves of *C. xanthocarpa* (*Guavira* in Mbyá-Guarani language) are used by indigenous for treatment of diarrhea, stomach pain and worms.

Ethnopharmacology rescues the historical uses of plants being recognized as valuable for bioprospection, since they provide the rationale for the selection and research of medicinal plants (Brandelli et al. 2011). This study describes the first report on the antiprotozoal activity of *Verbena* sp. and *C. xanthocarpa*. In addition, other species of the families Verbenaceae and Myrtaceae were tested against *T. vaginalis*, however, without success (Calzada et al. 2007; Desrivot et al. 2007). Several biodiversities and traditional knowledge of different populations have guided studies to search new prototypes drugs anti-*T. vaginalis*. Recently, the potential of plants traditionally used from Caatinga against *T. vaginalis* was reported (Frasson et al. 2011). Calzada et al. (2007) demonstrated that plants used for urogenital tract disorders in Mexican traditional medicine showed effect against this protozoan. Amaryllidaceae species used against venereal diseases in South Africa also showed promising activity against *T. vaginalis* (Giordani et al. 2010; Vieira et al. 2011).

Considering the impact of trichomonosis in public health and the emergent number of resistant *T. vaginalis* isolates, alternatives for the treatment of this infection are necessary. Natural products are a promising source of active molecules and the ethnopharmacology approach rescues population knowledge of medicinal plants. This wisdom combined with chemical and pharmacological studies present a precious value in the bioprospection of new, safe, and accessible drugs. This pioneer study demonstrated relevant results about anti-*T. vaginalis* activity of the *Verbena* sp. and *C. xanthocarpa*, plants traditionally used by indigenous population Mbyá-Guarani for infection diseases. Despite of showing strong anti-*T. vaginalis* activity, this report rescued the knowledge of indigenous people, avoiding the miscarriage of this wisdom.

Acknowledgments This work was supported by the NANOBIOTEC-Brazil program from CAPES and FAPERGS. The authors thank Chieftain José Cirilo Pires Morinico (tribe Mbyá-Guarani), for making possible the accomplishment of this study and for the valuable information.

References

- Ali V, Nozaki T (2007) Current therapeutics, their problems, and sulfur-containing-amino-acid metabolism as a novel target against infections by “amitochondriate” protozoan parasites. *Clin Microbiol Rev* 20:164–187
- Biavatti MW, Farias C, Curtius F, Brasil LM, Hort S, Schuster L, Leite SN, Prado SR (2004) Preliminary studies on *Campomanesia xanthocarpa* (Berg.) and *Cuphea carthagenensis* (Jacq.) J.F. Macbr. aqueous extract: weight control and biochemical parameters. *J Ethnopharmacol* 93:385-389
- Brandelli CLC, Giordani RB, Macedo AJ, De Carli GA, Tasca T (2011) Indigenous Traditional Medicine: Plants for the Treatment of Diarrhea. In: Heinz Mehlhorn. (Org.). *Nature Helps... How Plants and Other Organisms Contribute to Solve Health Problems*, 1st edn. Springer-Verlag, Berlin, pp 1-18
- Calvo MI (2006) Anti-inflammatory and analgesic activity of the topical preparation of *Verbena officinalis* L. *J Ethnopharmacol* 107:380-382
- Calzada F, Yépez-Mulia L, Tapia-Contreras A (2007) Effect of Mexican medicinal plant used to treat trichomoniasis on *Trichomonas vaginalis* trophozoites. *J Ethnopharmacol* 113:248-251
- Cherpes TL, Wiesenfeld HC, Melan MA, Kant JA, Cosentino LA, Meyn LA, Hillier SL (2006) The Associations Between Pelvic Inflammatory Disease, *Trichomonas vaginalis* Infection, and Positive Herpes Simplex Virus Type 2 Serology. *Sex Transm Dis* 33:747-752
- Coutinho DF, Travassos LMA, Amaral FMM (2002) Estudo etnobotânico de plantas medicinais utilizadas em comunidades indígenas no estado do Maranhão – Brasil. *Visão Acadêmica* 3:7-12
- Diamond LS (1957) The establishment of various *Trichomonas* of animals and man in axenic cultures. *J Parasitol* 43:488–490

- Desrivot J, Waikedre J, Cabalion P, Herrenknecht C, Bories C, Hocquemiller R, Fournet A (2007) Antiparasitic activity of some New Caledonian medicinal plants. *J Ethnopharmacol* 112:7-12
- Duarte M, Giordani RB, De Carli GA, Zuanazzi JA, Macedo AJ, Tasca T (2009) A quantitative resazurin assay to determinate the viability of *Trichomonas vaginalis* and the cytotoxicity of organic solvents and surfactant agents. *Exp Parasitol* 123:195–198
- Elisabetsky E, Wannmacher L (1993) The status of ethnopharmacology in Brazil. *J Ethnopharmacol*. 38:137-143
- Frasson AP, Dos Santos O, Duarte M, da Silva Trentin D, Giordani RB, da Silva AG, da Silva MV, Tasca T, Macedo AJ (2011) First report of anti-*Trichomonas vaginalis* activity of the medicinal plant *Polygala decumbens* from the Brazilian semi-arid region, Caatinga. *Parasitol Res* [Epub ahead of print]
- Gilani AH, Atta-ur-Rahman (2005) Trends in ethnopharmacology. *J Ethnopharmacol* 100:43-49
- Giordani RB, Vieira Pde B, Weizenmann M, Rosemberg DB, Souza AP, Bonorino C, De Carli GA, Bogo MR, Zuanazzi JA, Tasca T (2010) Candimine-induced cell death of the amitochondriate parasite *Trichomonas vaginalis*. *J Nat Prod* 73:2019-2023
- Giordani RB, Vieira Pde B, Weizenmann M, Rosemberg DB, Souza AP, Bonorino C, De Carli GA, Bogo MR, Zuanazzi JA, Tasca T (2011) Lycorine induces cell death in the amitochondriate parasite, *Trichomonas vaginalis*, via an alternative non-apoptotic death pathway. *Phytochemistry* 72:645–650
- Grodstein F, Goldman MB, Cramer DW (1993) Relation of tubal infertility to history of sexually transmitted diseases. *Am J Epidemiol* 137:577-584
- Heinrich M (2003) Ethnobotany and natural products: the search for new molecules, new treatments of old diseases or a better understanding of indigenous cultures? *Curr Top Med Chem* 3:1411-1454
- Klebanoff MA, Carey JC, Hauth JC, Hillier SL, Nugent RP, Thom EA, Ernest JM, Heine RP, Wapner RJ, Trout W, Moawad A, Leveno KJ, Miodovnik M, Sibai BM, Van Dorsten JP,

- Dombrowski MP, O'Sullivan MJ, Varner M, Langer O, McNellis D, Roberts JM; National Institute of Child Health and Human Development Network of Maternal-Fetal Medicine Units (2001) Failure of metronidazole to prevent preterm delivery among pregnant women with asymptomatic *Trichomonas vaginalis* infection. *N Engl J Med* 345:487-493
- Lai SW, Yu MS, Yuen WH, Chang RC (2006) Novel neuroprotective effects of the aqueous extracts from *Verbena officinalis* Linn. *Neuropharmacology* 50:641-650
- Markman BE, Bacchi EM, Kato ET (2004) Antiulcerogenic effects of *Campomanesia xanthocarpa*. *J Ethnopharmacol* 94:55-57
- Petrin D, Delgaty K, Bhatt R, Garber G (1998) Clinical and microbiological aspects of *Trichomonas vaginalis*. *Clin Microbiol Rev* 11:300–317
- Rego FLH, Brand AJ, Costa RB (2010) Genetic resources, biodiversity, traditional knowledge Guarani Kaiowá and local development. *Interações* 11:55-69
- Ríos JI, Recio MC (2005) Medicinal plants and antimicrobial activity. *J Ethnopharmacol* 100:80-84
- Rocha TD, de Brum Vieira P, Gnoatto SC, Tasca T, Gosmann G (2012) Anti-*Trichomonas vaginalis* activity of saponins from *Quillaja*, *Passiflora*, and *Ilex* species. *Parasitol Res* [Epub ahead of print]
- Schwebke JR, Barrientes FJ (2006) Prevalence of *Trichomonas vaginalis* isolates with resistance to metronidazole and tinidazole. *Antimicrob Agents Chemother* 50:4209-4210
- Speroni E, Cervellati R, Costa S, Guerra MC, Utan A, Govoni P, Berger A, Müller A, Stuppner H (2007) Effects of differential extraction of *Verbena officinalis* on rat models of inflammation, cicatrization and gastric damage. *Planta Med* 73:227-335
- Sorvillo F, Smith L, Kerndt P, Ash L (2001) *Trichomonas vaginalis*, HIV, and African-Americans. *Emerg Infect Dis* 7:927-932
- Sun Y, Tong H, Li M, Li Y, Guan S, Liu J (2008) Immunological adjuvant effect of Japanese ginseng saponins (JGS) on specific antibody and cellular response to ovalbumin and its haemolytic activities. *Vaccine* 26:5911–5917

Van Der Pol B, Kwok C, Pierre-Louis B, Rinaldi A, Salata Robert A, Chen P-L, van de Wijgert J, Mmiro F, Mugerwa R, Chipato T, Morrison CS (2008) *Trichomonas vaginalis* infection and human immunodeficiency virus acquisition in African women. *J Infect Dis* 197:548–554

Viikki M, Pukkala E, Nieminen P, Hakama M (2000) Gynaecological infections as risk determinants of subsequent cervical neoplasia. *Acta Oncol* 39:71-75

World Health Organization (2001) Global prevalence and incidence of selected curable sexually transmitted infections. Overview and estimates, WHO, Geneva

Table 1 Hemolytic activity of the aqueous extracts that showed the best anti-*Trichomonas vaginalis* activity and respective MIC determined by susceptibility assay.

	Aqueous extract	
	<i>Verbena</i> sp.	<i>Campomanesia xanthocarpa</i>
MIC (mg/mL)	4.0	4.0
Hemolysis (%)	6.5	7.6

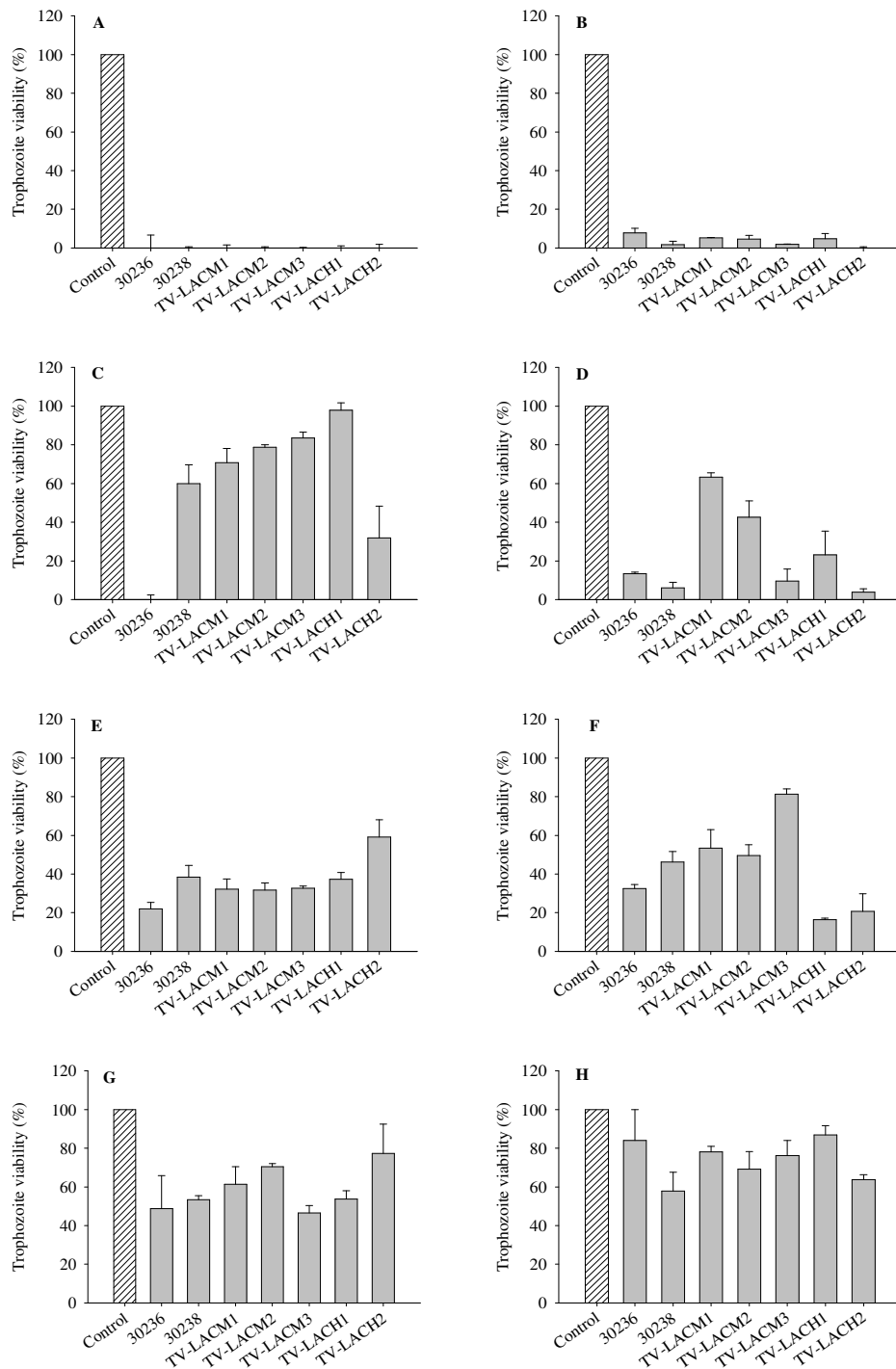


Fig 1 Effect of selected Mbyá-Guarani medicinal plants at 4.0 mg/mL on different *Trichomonas vaginalis* isolates. **A** *Verbena* sp. **B** *Campomanesia xanthocarpa*. **C** *Bidens pilosa*. **D** *Luehea divaricata*. **E** *Coix lacryma-jobi*. **F** *Trichilia* sp. **G** *Citrus limonium*. **H** *Aloe arborescens*. **I** *Citrus reticulata*. **J** *Rhaphis baccifera*. Data represent means \pm standard deviation.

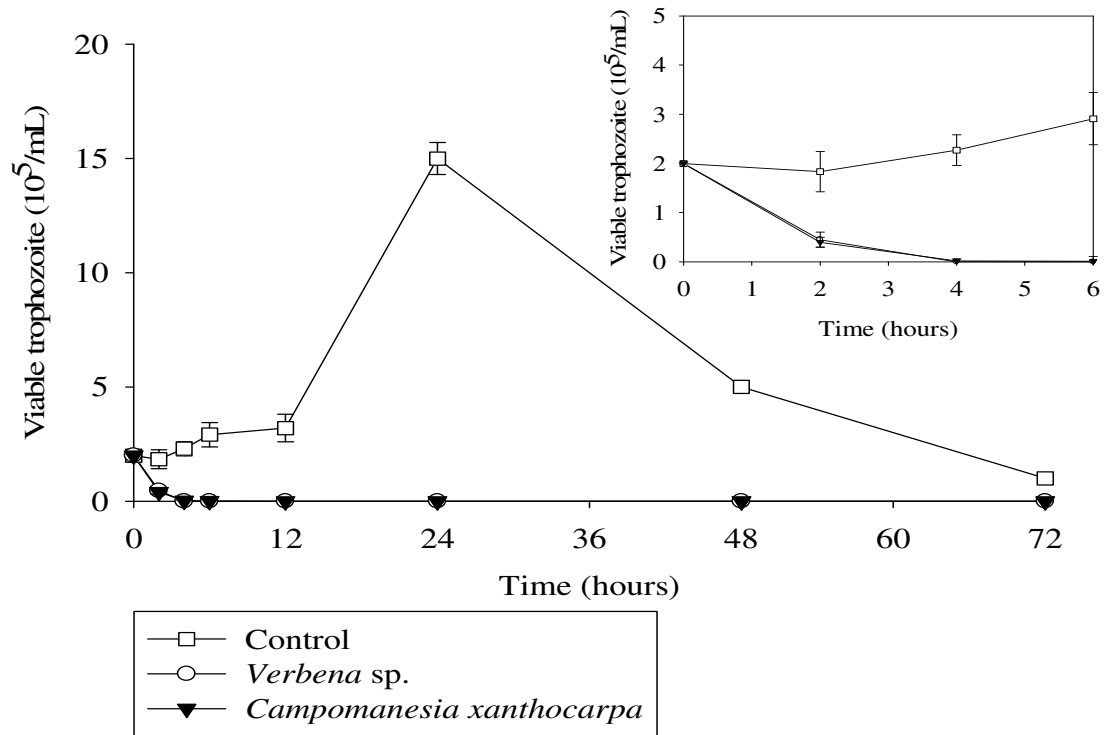


Fig 2 Kinetic growth curve of *Trichomonas vaginalis* 30236 isolate after treatment with aqueous extracts of *Verbena* sp. and *Campomanesia xanthocarpa* at 4.0 mg/mL. The trophozoites growth was completely inhibited by the extracts in 4 hours of incubation. Data represent means \pm standard deviation of at least three experiments, all in triplicate.

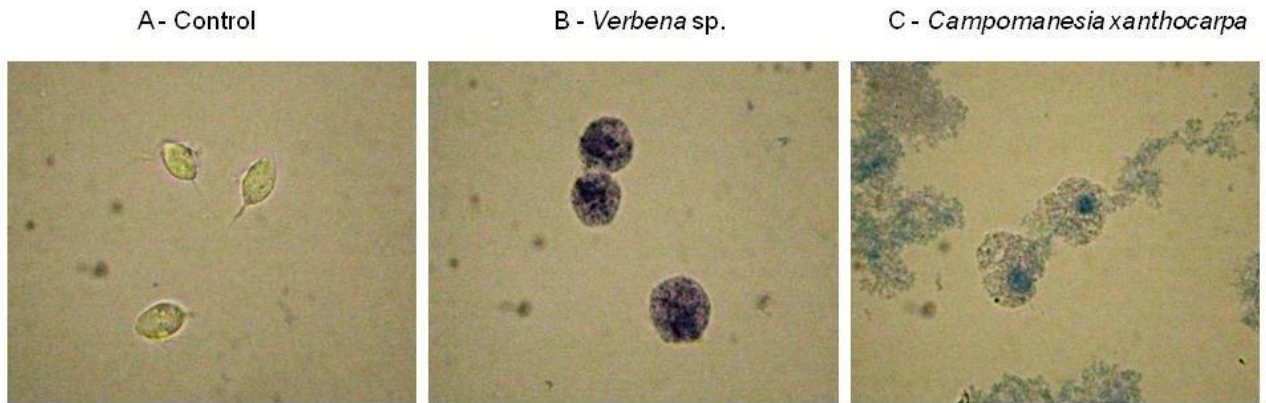


Fig 3 Microscopic analysis of parasites morphology in light microscope (magnified $\times 1,000$) by trypan blue dye exclusion. **A** Control; **B** After 4 hours of treatment with aqueous extract of *Verbena* sp.; **C** After 4 hours of treatment with aqueous extract of *Campomanesia xanthocarpa*.

III.3. CAPÍTULO 3 – Clara Lia Costa Brandelli, Janine Treter, Tiana Tasca and Alexandre José Macedo. *In vitro* demonstration of the Mbyá-Guarani tradicional usage of *Luehea divaricata* against pathogenic bacterial biofilm

***In vitro* demonstration of the Mbyá-Guarani tradicional usage of *Luehea divaricata* against pathogenic bacterial biofilm**

Clara Lia Costa Brandelli, Janine Treter, Tiana Tasca and Alexandre José Macedo*

Faculdade de Farmácia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Av. Ipiranga 2752, 90610-000, Porto Alegre, RS, Brazil.

*Corresponding author at: Faculdade de Farmácia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Rio Grande do Sul, Brazil. Av. Ipiranga, 2752, 90610-000, Porto Alegre, Brazil. Tel.: +55 51 33086082; fax: +55 51 33087309. E-mail address: alexandre.macedo@ufrgs.br (A.J. Macedo)

ABSTRACT

Ethnopharmacological relevance: This study investigated the antibiotic and antibiofilm activities of *Luehea divaricata* Mart. (Tiliaceae) - plant traditionally used by indigenous Mbyá-Guarani, South Brazil, for the treatment of infectious diseases.

Material and methods: Aqueous, hydroalcoholic, acetonitrile and ethyl acetate extracts from barks of *L. divaricata* were evaluated against biofilm formation and planktonic cells of *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 and *Staphylococcus epidermidis* ATCC 35984. The in vitro activity was corroborated by kinetic growth curve and scanning electron microscopy (SEM). Also, hemolytic activity in human blood of active extracts was performed.

Results: Aqueous, hydroalcoholic and acetonitrile extracts strongly inhibited the biofilm formation for both pathogens, instead ethyl acetate extract showed effect only upon biofilm formation of *S. epidermidis*. The hydroalcoholic extract allowed 26.9% and 10.5% of biofilm formation of *P. aeruginosa* and *S. epidermidis*, respectively. The hydroalcoholic extract acts inhibiting the bacterial adhesion without antibiotic activity of *S. epidermidis*; in *P. aeruginosa*, the extract inhibited the biofilm formation as a consequence of a bactericidal effect. This fact was evidenced by SEM images that demonstrated distinct profiles of bacterial adhesion, matrix production and bacterial morphology. In addition, the hydroalcoholic extract do not promote a significant hemolytic activity against human erythrocytes.

Conclusion: Our study is the first to describe the antibiofilm and antibacterial activities by *Luehea divaricata* against *P. aeruginosa* and *S. epidermidis*. Furthermore, it confirms the ethnopharmacological use, by Indians Mbyá-Guarani, of this plant for cough with secretion, emphasizing the importance of indigenous knowledge in the search for new bioactive agents.

Keywords: Biofilm, *Staphylococcus epidermidis*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Luehea divaricata* Mart., Mbyá-Guarani ethnopharmacology

1. Introduction

Natural products provide major sources of innovative bioactive compounds (Cos et al., 2006). A potential strategy is to achieve new substances systematically based on traditional use (Cordell and Colvard, 2005). Brazilian indigenous communities have a rich heritage about medicinal plants uses. Mbyá-Guarani ethnic group diverge from the other Brazilian Indians because they have extremely ingrained cultural traits, and one aspect that characterizes this group is their relationship with nature - especially with plants (Lindenmaier, 2008). Thereby, this group can provide a valuable directing in the investigation of plants as approach to combat pathogenic biofilms.

Mbyá-Guarani tribe, located in South of Brazil, employ several medicinal plants, based on their ancient wisdom about the nature. An important plant utilized for infectious disease treatment, specifically, cough with abundant secretion is *Luehea divaricata* Mart. (Tiliaceae). *L. divaricata*, commonly known as “açoita-cavalo”, is a tree that grows in Brazil, Argentina and Paraguay (Bieski et al., 2012). In Brazilian folk medicine, *L. divaricata* pharmacogens are commonly used: (i) leaves as diuretic; (ii) stems as anti-inflammatory; (iii) flowers infusion against bronchitis; (iv) roots as depurative agent and (v) decoction of barks and aerial parts for healing skin wounds, pimples, and vaginal washes (Tanaka et al., 2003; 2005). Moreover, aqueous extracts of this plant showed lack toxicity *in vivo* (Bighetti et al., 2004) and low mutagenicity *in vitro* (Felício et al., 2011). However, there is no scientific evidence of *L. divaricata* use on cough as well as its antimicrobial properties remains controverse (Bieski et al., 2012). Studies have demonstrated its inhibitory effect on dermatophytes growth (Zacchino et al., 1998) although not in other fungi species (Tanaka et al., 2005), whereas methanolic barks extracts showed moderate antibiotic activity against *Staphylococcus aureus* (Tanaka et al., 2005).

Regarding nosocomial infections, it is well known that one of most challenging problem in the hospital is when the microbial chronic infections are related to biofilm formation. Biofilm might be described as the ability of bacteria to organize into matrix-enclosed aggregates (Burmølle et al., 2010). The protective nature of their structure allow the bacterial biofilms to be 10–1,000-fold less susceptible to antimicrobial agents and host immune response, reduced complement system activation, in comparison to their planktonic counterparts (Davies, 2003; Hoiby et al., 2010).

Among the most common pathogens associated with infections, stand out *Staphylococcus* sp. and *Pseudomonas aeruginosa* (Toutain-Kidd et al., 2009). Staphylococci are currently the most general cause of nosocomial infections (Antunes et al., 2011) in particular, associated to medical devices such as catheters, contact lenses and prostheses (Treter and Macedo, 2011) whereas *P. aeruginosa* are mostly resistant to several antibiotics (Breidensten et al., 2009) and also the major cause of chronic lung infections in cystic fibrosis patients (Toté et al., 2009; Häussler, 2010). Biofilm infections management is complicated since nosocomial-related infections despite of reducing the efficiency of the antimicrobial treatment extend the length of stay in hospitals, costs and morbidity (Rosenthal, 2008; Otto, 2009). As a consequence of bacterial biofilms problematic, there is an urgent need to discover effective therapies and possible strategies to combat these challenges.

In this context, Mbyá-Guarani knowledge might be a contributor directing the choice of plants for studies; therefore, the aim of this work was to investigate antibiotic and antibiofilm activities of barks from *L. divaricata* against the pathogens *P. aeruginosa* and *S. epidermidis*.

2. Materials and Methods

2.1. Plant material and extracts

Luehea divaricata barks were collected in indigenous tribe Mbyá-Guarani located at the Lomba do Pinheiro, Porto Alegre, RS, Brazil (30°06'47.62" S and 51°07'37.85" W), in March 2011. The voucher specimens were deposited at the herbarium of the Universidade Federal do Rio Grande do Sul under the code ICN 167403. Extract preparation was performed according the traditional use by decoction, at 60 °C for 60 min (10% w/v) and further freeze-dried (Edwards, USA). Additionally, extraction with water:ethanol (50% v/v), acetonitrile and ethyl acetate was performed for 24 h to obtain a greater number of chemical compounds. These extracts were concentrated under vacuum and freeze-dried.

The aqueous and hydroalcoholic extracts were dissolved in ultrapure water. The acetonitrile and ethyl acetate extracts were dissolved in 10% (v/v) dimethyl-sulfoxide (DMSO) in tryptone soya broth (TSB) (Oxoid Ltd., England). All work solutions were prepared at 10 mg/mL, sterilized by filtration (0.22 µm) and stored at – 20 °C.

2.2. Antibiofilm and antibiotic assays

2.2.1. Bacterial strains and inoculums

The gram negative and gram positive bacteria were used for the experiment as model of biofilm formation: *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 and *Staphylococcus epidermidis* ATCC 35984, respectively. Bacterial strains were grown in Mueller Hinton agar (Oxoid Ltd., England) for 24 h at 37 °C. The bacterial suspensions were prepared in 0.9% saline, corresponding to 1 McFarland scale (3×10^8 CFU/mL).

2.2.2. Antibiofilm activity

The antibiofilm formation assay was performed in microplates as described by Trentin et al. (2011). In brief, bacterial suspensions were added to each well with the extracts (concentration 4.0 mg/mL in the wells) and TSB. The plates were incubated for 6 h (for *P. aeruginosa*) and 24 h (for *S. epidermidis*) at 37 °C. To remove non-adherent cells, the wells were rinsed three times with sterile saline and the attached bacteria were heat-fixed at 60 °C. Crystal violet (0.4%) was used to stain the biofilm and eluted with 99.5% DMSO (Sigma–Aldrich Co., USA) and the absorbance was measured at 570 nm (Spectramax M2^e Multimode Microplate Reader, Molecular Devices, USA). The positive control of biofilm formation consisted in a bacterial suspension, TSB and water (to represent the water soluble extracts) or TSB with 10% DMSO.

2.2.3. Antibiotic activity

Planktonic susceptibility was evaluated by the difference between the OD₆₀₀ absorbance measured at the end and at the beginning of the incubation time in microtiter plates. In the positive control, the extracts were replaced by water and being considered to represent 100% of planktonic bacterial growth. Rifampicin 8 µg/mL (Sigma–Aldrich Co., USA) was used as inhibition control of *S. epidermidis* growth and gentamicin 8 µg/mL for *P. aeruginosa*.

2.3. Kinetic growth curve

In order to investigate the effect of the most promising extracts on *P. aeruginosa* and *S. epidermidis* in biofilm formation and planktonic growth, a kinetic

curve was performed. The hydroalcoholic extract was tested after 0.4, 2.2, 4.0 mg/mL. The biofilm formation and planktonic bacterial growth were evaluated in 3, 6, 12, 24 and 48 h, as described in the items above.

2.4. Hemolytic assay

Hemolytic assay was performed according to Rocha et al. (2012). Blood type O positive from healthy human volunteers was collected in Alsever's solution (1:1, v/v) and centrifuged at 2,000 rpm for 5 min. The erythrocytes were washed with phosphate-buffered saline (pH 7.0), then resuspended to 1.0% (v/v). This suspension was incubated with hydroalcoholic extract at 0.4, 2.2 and 4.0 mg/mL concentrations at 37 °C under agitation for 1 h, followed by centrifugation at 3,000 rpm for 5 min. Supernatant absorbance was measured at 540 nm. The percentage of hemolysis was calculated in comparison to a 100% hemolytic saponin from *Quillaja saponaria* (Sun et al. 2008). The assay was carried out in triplicate in three independent experiments.

2.5. Scanning electron microscopy (SEM): biofilm visualization

PERMANOX™ slices (1.0 x 0.5 cm) were incubated with bacterial suspension as described in section 2.3.2. After 3, 12 and 24 h of incubation at 37° C, the samples were washed with saline solution, fixed in glutaraldehyde (2.5%) and washed in cacodylate buffer (pH 7.2). Then, dehydrated in growing concentrations of acetone. The slides were dried by the CO₂ critical point technique (CPD 030 Balzers, Liechtenstein), covered with gold film and checked in a scanning electron microscope (JEOL JSM-6060).

3. Results and Discussion

Bacterial adhesion and subsequent biofilm formation is a major cause of chronic infections due to the resistance to antimicrobials and the host immune system (Davies, 2003). Undoubtedly, the ethnopharmacological knowledge is one interesting way to enhance the probability of success in new drug-finding efforts. Select plants traditionally used against infectious diseases can be an excellent strategy in the investigation of new antimicrobial agents, showing that compounds from natural origin still provide a high number of interesting structures (Artini et al., 2012).

Sparse prior evidence showed that *Luehea divaricata* may contain active principles against microbial pathogens; however, our study is the first report of antibiotic and antibiofilm activities from *L. divaricata* barks extracts against *Pseudomonas aeruginosa* and *Staphylococcus epidermidis*. At 4.0 mg/mL, the aqueous, hydroalcoholic and acetonitrile extracts strongly inhibited the biofilm formation in 6 h (for *P. aeruginosa*) and 24 h (for *S. epidermidis*) (Table 1). Whereas the ethyl acetate extract showed effect only in the biofilm formation of *S. epidermidis*. Taking into account that the hydroalcoholic extract allowed 26.9% and 10.5% of biofilm formation of *P. aeruginosa* and *S. epidermidis*, respectively. The kinetic growth curve, scanning electron microscopy and hemolytic assay were performed with this sample. Furthermore, interestingly, this extract inhibited *S. epidermidis* biofilm formation by a mechanism that did not involve planktonic cells death (Table 1).

The kinetic growth curve of the hydroalcoholic extract was performed in 0.4, 2.2 and 4.0 mg/mL and biofilm formation and bacterial growth were evaluated in 3, 6, 12, 24 and 48 h. The results showed that the extract induces inhibition of biofilm after 3 h for both pathogens, however, this seems to occur by distinct mechanism of action for each bacteria, as can be observed for the different profiles in Figure 1. While in biofilm formation of *S. epidermidis* the extract act inhibiting the bacterial adhesion without antibiotic activity as for *P. aeruginosa*, when the extract inhibited the biofilm formation, probably, in consequence of planktonic cell death. This fact was further evidenced by SEM after 3, 12 and 24 h of incubation (Figure 2 and 3). To a different plant, *Croton nepetaefolius*, a diametrically opposed profile was observed for the same species of gram positive and gram negative bacteria, among others, where the antibiotic activity occurred only for Gram positive (Carneiro et al., 2010). This kind of mechanism of biofilm inhibition, without affecting the bacterial growth, seems to be highly promising since the selective force will not be acting upon the common mechanisms known for antibiotics (Bjarnsholt and Givskov, 2007).

For both pathogens, the biofilm formation control showed a progressive increase over time, and in 24 h an uniform and dense mature biofilm was observed (Figure 2 and 3, panel A, B and C). In contrast, treated *P. aeruginosa* and *S. epidermidis* biofilms displayed an important reduction in the number of adherent bacteria (Figure 2 and 3, panel D, E and F). Moreover, for both pathogens occurs a

deformation in the bacterial cell shape. In addition, treated *P. aeruginosa* biofilms present decreased matrix production (Figure 2, panel E and F).

For evaluation of cytotoxicity data from *L. divaricata* barks against mammalian cells, the hemolysis assay was performed. The hydroalcoholic extract was tested at 0.4, 2.2 and 4.0 mg/mL and demonstrated 2.2, 0.8 and 5.7 % lyse of human erythrocytes, respectively. These results demonstrated that the extract did not promote a significant hemolytic activity, and then, suggest that is not toxic to mammalian cells.

In conclusion, we have shown that extracts of *L. divaricata* fulfill the requirements for inhibition of biofilm formation without bactericidal activity. Indian wisdom directed the choice of this plant for antibiofilm evaluation, thus representing promising scaffolds to use this plant for further development of antibacterial drugs which may overcome the appearance of resistance and be an alternative treatment.

Acknowledgments This work was supported by the NANOBIOTEC-Brazil program from CAPES and FAPERGS. The authors thank Chieftain José Cirilo Pires Morinico (tribe Mbyá-Guarani), for making possible the accomplishment of this study and for the valuable information.

References

- Antunes, A.L.S., Bonfanti, J.W., Perez, L.R.R., Pinto, C.C.F., Freitas, A.L.P., Macedo, A.J., Barth, A.L., 2011. High vancomycin resistance among biofilms produced by *Staphylococcus* species isolated from central venous catheters. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz* 106, 51-55.
- Artini, M., Papa, R., Barbato, G., Scoarughi, G.L., Cellini, A., Morazzoni, P., Bombardelli, E., Selan, L., 2012. Bacterial biofilm formation inhibitory activity revealed for plant derived natural compounds. *Bioorganic & Medicinal Chemistry* 15, 920-926.
- Bjarnsholt, T., Givskov, M., 2007. Quorum-sensing blockade as a strategy for enhancing host defences against bacterial pathogens. *Philosophical Transactions B* 362, 1213–1222.
- Bieski, I.G., Rios Santos, F., de Oliveira, R.M., Espinosa, M.M., Macedo, M., Albuquerque, U.P., de Oliveira Martins, D.T., 2012. Ethnopharmacology of medicinal plants of the pantanal region (Mato Grosso, Brazil). *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine* 2012, 272749.
- Bighetti, A.E., Antônio, M.A., Possenti, A., Foglio, M.A., Siqueira, M.G., Carvalho, J.E., 2004. Efeitos da administração aguda e subcrônica da *Luehea divaricata* Martus et Zuccarini *Lecta* 22, 53–58.
- Breidenstein, E.B., de la Fuente-Núñez, C., Hancock, R.E., 2011. *Pseudomonas aeruginosa*: all roads lead to resistance. *Trends Microbiology* 19, 419-426.
- Burmølle, M., Thomsen, T.R., Fazli, M., Dige, I., Christensen, L., Homøe, P., Tvede, M., Nyvad, B., Tolker-Nielsen, T., Givskov, M., Moser, C., Kirketerp-Møller, K., Johansen, H.K., Høiby, N., Jensen, P.Ø., Sørensen, S.J., Bjarnsholt, T., 2010. Biofilms in chronic infections - a matter of opportunity - monospecies biofilms in multispecies infections. *FEMS Immunology and Medical Microbiology* 59, 324-336.
- Carneiro, V.A., Santos, H.S., Arruda, F.V., Bandeira, P.N., Albuquerque, M.R., Pereira, M.O., Henriques, M., Cavada, B.S., Teixeira, E.H. Casbane diterpene as a promising natural antimicrobial agent against biofilm-associated infections. *Molecules* 16, 190-201.
- Cordell, G.A., Colvard, M.D., 2005. Some thoughts on the future of ethnopharmacology. *Journal of Ethnopharmacology* 100, 5–14.

- Cos, P., Vlietinck, A.J., Berghe, D.V., Maes, L., 2006. Anti-infective potential of natural products: how to develop a stronger in vitro 'proof-of-concept'. *Journal of Ethnopharmacology* 106, 290-302.
- Davies, D., 2003. Understanding biofilm resistance to antimicrobial agents. *Nature Reviews Drug Discovery* 2, 114-122.
- Felício, L.P., Silva, E.M., Ribeiro, V., Miranda, C.T., Vieira, I.L., Passos, D.C., Ferreira, A.K., Vale, C.R., Lima, D.C., Carvalho, S., Nunes, W.B., 2011. Mutagenic potential and modulatory effects of the medicinal plant *Luehea divaricata* (Malvaceae) in somatic cells of *Drosophila melanogaster*. SMART/wing. *Genetics and Molecular Research* 10, 16–24.
- Häussler, S., 2010. Multicellular signalling and growth of *Pseudomonas aeruginosa*. *International Journal of Medical Microbiology* 300, 544-548.
- Høiby, N., Bjarnsholt, T., Givskov, M., Molin, S., Ciofu, O., 2010. Antibiotic resistance of bacterial biofilms. *International Journal of Antimicrobial Agents* 35, 322–332.
- Lindenmaier, D.S., Putzke, J., 2011. Ethnobotanical study in three communities Mbya/Guarani in the central region of Rio Grande do Sul/Brazil. *Caderno de Pesquisa série Biologia* 23, 6-19.
- Otto, M., 2009. *Staphylococcus epidermidis* — the 'accidental' pathogen. *Nature Reviews Microbiology* 7, 555-567.
- Rocha, T.D., de Brum Vieira, P., Gnoatto, S.C., Tasca, T., Gosmann, G., 2012. Anti-*Trichomonas vaginalis* activity of saponins from *Quillaja*, *Passiflora*, and *Ilex* species. *Parasitology Research* 110, 2551-2556.
- Rosenthal, V.D., 2008. Device-associated nosocomial infections in limited-resources countries: Findings of the International Nosocomial Infection Control Consortium (INICC). *American Journal of Infection Control*, 36, S171.e7- S171.e12.
- Siqueira, M.G. Atividade antiulcerogênica do extrato bruto hidroalcoólico da *Luehea divaricata* Martus et Zuccarini. Tese de Mestrado. Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas. 2006.
- Sun, Y., Tong, H., Li, M., Li, Y., Guan, S., Liu, J., 2008. Immunological adjuvant effect of Japanese ginseng saponins (JGS) on specific antibody and cellular response to ovalbumin and its haemolytic activities. *Vaccine* 26, 5911–5917.
- Tanaka, J.C.A., Vidotti, G.J., da Silva, C.C., 2003. A new tormentic acid derivative from *Luehea divaricata* Mart. (Tiliaceae). *Journal of the Brazilian Chemical Society* 14, 475-478.

- Tanaka, J.C.A., Silva, C., Dias Filho, B.P., Nakamura, C.V., Carvalho, J.E., Foglio, M.A., 2005. Constituintes químicos de *Luehea divaricata* Mart. (Tiliaceae). *Química Nova* 28, 834-837.
- Toté, K., Berghe, D.V., Deschacht, M., De Wit, K., Maes, L., Cos, P., 2009. Inhibitory efficacy of various antibiotics on matrix and viable mass of *Staphylococcus aureus* and *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. *International Journal of Antimicrobial Agents* 33, 525-531.
- Toutain-Kidd, C.M.; Kadivar, S.C.; Bramante, C.T.; Bobin, S.A.; Zegans, M.E., 2009. Polysorbate 80 inhibition of *Pseudomonas aeruginosa* biofilm formation and its cleavage by the secreted lipase LipA. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 53, 136-145.
- Trentin, D.D., Giordani, R.B., Zimmer, K.R., da Silva, A.G., da Silva, M.V., Correia, M.T., Baumvol, I.J., Macedo, A.J., 2011. Potential of medicinal plants from the Brazilian semi-arid region (Caatinga) against *Staphylococcus epidermidis* planktonic and biofilm lifestyles. *Journal of Ethnopharmacology* 137, 327-335.
- Treter, J., Macedo, A.J., 2011. Catheters: a suitable surface for biofilm formation, in: Méndez-Vilas A (Ed.), *Science against microbial pathogens: communicating current research and technological advances*. Badajoz, Formatex Research Center, pp. 835-842.
- Zacchino, S., Santecchia, C., López, S., Gattuso, S., Muñoz, J.D., Cruaños, A., Vivot, E., Cruaños M.C., Salinas A., Ruiz, R.E., Ruiz, S., 1998. *In vitro* antifungal evaluation and studies on mode of action of eight selected species from the Argentine flora. *Phytomedicine* 5, 389-395.
- Wagner, H, Bladt, S., 1996. *Plant drug analysis: a thin layer chromatography atlas*, second ed. Springer-Verlag, Berlin.

Table 1.

Biofilm formation and bacterial growth effect of *Luehea divaricata* barks extracts at 4.0 mg/mL

Extracts	<i>P. aeruginosa</i> ^a		<i>S. epidermidis</i> ^b	
	Biofilm formation (%)	Bacterial growth (%)	Biofilm formation (%)	Bacterial growth (%)
Aqueous	26.8 ± 2.4	20.1 ± 2.3	14.1 ± 3.1	7.7 ± 11.2
Hydroalcoholic	26.9 ± 2.5	39.0 ± 3.1	10.5 ± 0.8	78.2 ± 14.4
Acetonitrile	27.4 ± 2.4	0 ± 3.6	15.4 ± 1.6	0 ± 13.5
Ethyl acetate	66.2 ± 3.5	8.3 ± 5.8	7.4 ± 0.8	46.0 ± 2.1

Results represent mean ± standard deviation of 3 experiments.

^a 6 h of incubation; ^b 24 h of incubation

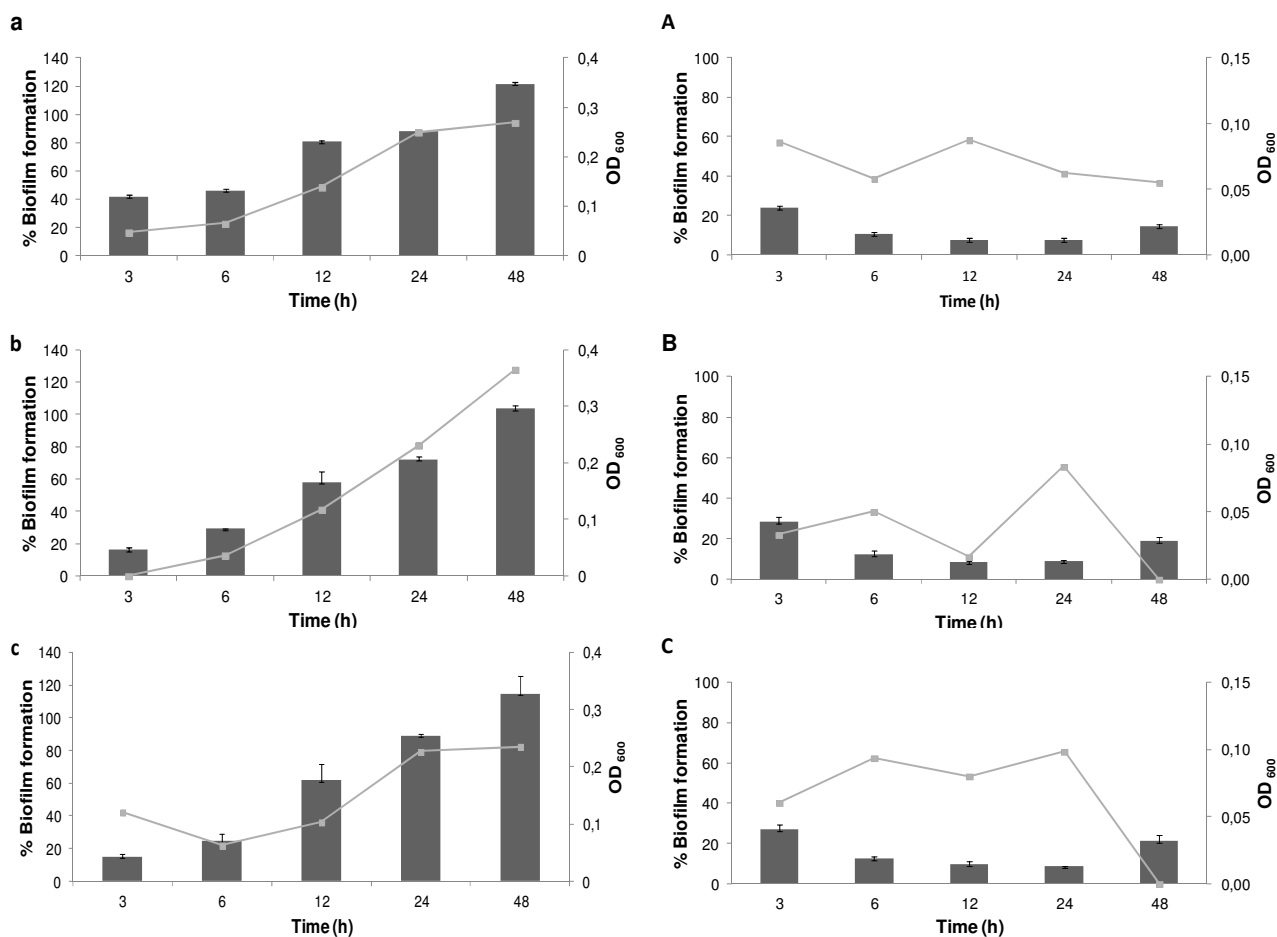


Fig 1 Kinetic growth curve of biofilm formation (bars) and bacterial growth (lines) for: *Pseudomonas aeruginosa* (a, b, and c) and *Staphylococcus epidermidis* (A, B and C) after treatment with *Luehea divaricata* hydroalcoholic extract at 0.4 (a and A); 2.2 (b and B) and 4.0 mg/mL (c and C). Data correspond to means \pm standard deviation of at least three experiments, all in triplicate.

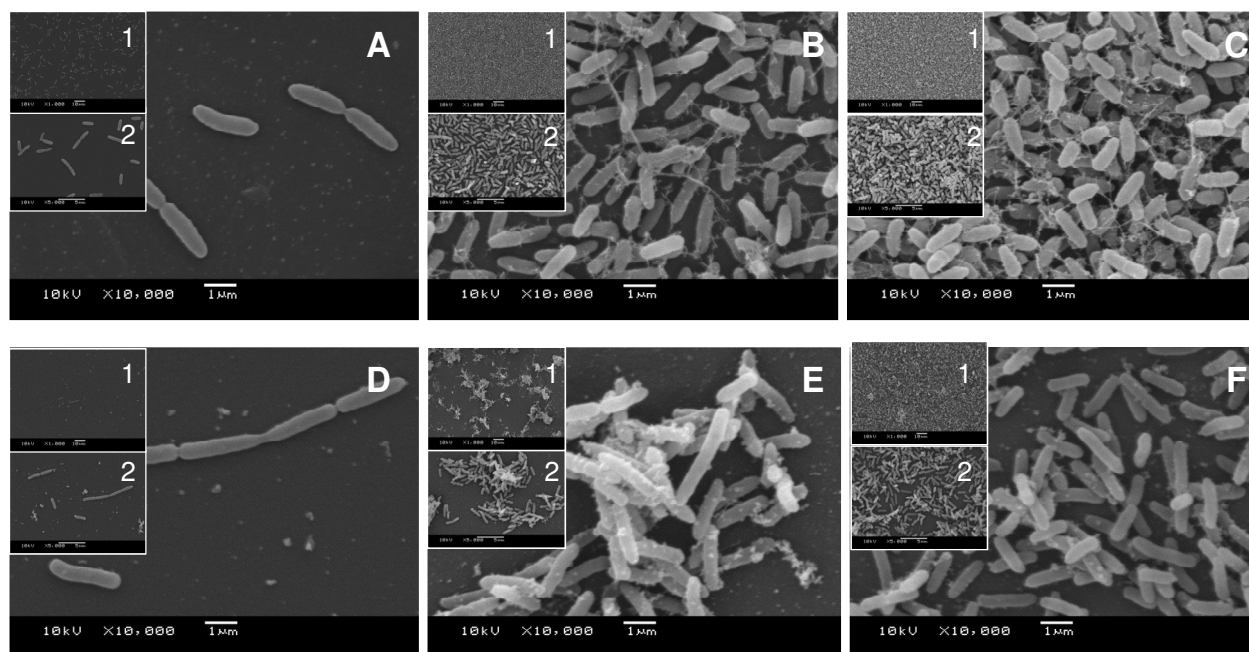


Fig 2 Scanning electron microscopy images of *Pseudomonas aeruginosa* biofilms at 3, 12 and 24 h upon Permanox™. Untreated biofilms (control for biofilm formation) (A – 3 h); (B – 12 h); (C – 24 h); Hydroalcoholic extract-treated biofilm (D – 3 h); (E – 12 h); (F– 24 h). Scale bars: 10,000x magnification (in the images: insert 1 – 1,000x magnification and insert 2- 5,000x magnification)

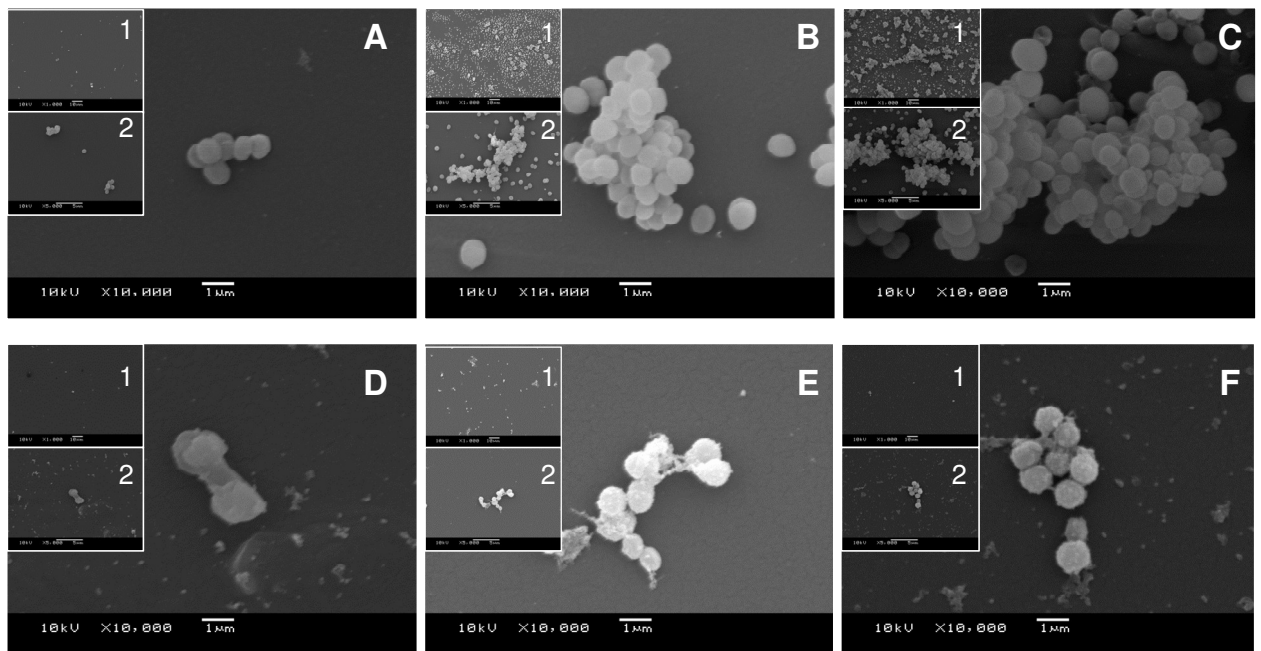


Fig 3. Scanning electron microscopy images of *Staphylococcus epidermidis* biofilms of at 3, 12 and 24 h upon Permanox™. Untreated biofilms (control for biofilm formation) (A – 3 h); (B – 12 h); (C – 24 h); Hydroalcoholic extract-treated biofilm (D – 3 h); (E – 12 h); (F– 24 h). Scale bars: 10,000x magnification (in the images: insert 1 – 1,000x magnification and insert 2- 5,000x magnification).

IV. Discussão Geral

A estratégia desta investigação de plantas medicinais seguiu a abordagem etnofarmacológica, que conforme ELISABETSKY (2000) consiste em “combinar informações adquiridas junto a comunidades locais que fazem uso da flora medicinal com estudos químicos e farmacológicos”. Além disso, a escolha de espécies de plantas para avaliação biológica, justificada por um efeito terapêutico em humanos, torna-se um valioso atalho para a descoberta de medicamentos, pois o seu uso tradicional pode ser interpretado como uma pré-triagem na pesquisa de efeitos terapêuticos (ELISABETSKY, 2003). A população indígena é reconhecida por possuir um patrimônio de informações sobre a biodiversidade e de como captar e utilizar os recursos naturais a sua volta (REGO *et al.*, 2010). Desta forma, elegemos a tribo Mbyá-Guarani, *Tekoá Anhetenguá*, localizada na Lomba do Pinheiro em Porto Alegre - RS, para esta avaliação etnofarmacológica.

No sentido de adquirir os conhecimentos desta população, foram realizadas conversas/entrevistas com as pessoas indicadas pelo Cacique José Cirilo Pires Morinico, como possuidoras de conhecimento, experiência e tradição na utilização da natureza que circunda a aldeia. A fim de direcionarmos a procura por plantas medicinais para as nossas avaliações biológicas desejadas - atividade antibiótica, antibiofilme e anti-*Trichomonas vaginalis* – selecionamos doenças e sintomas que poderiam estar relacionados com infecções bacterianas e parasitárias. Neste sentido, a busca por plantas medicinais para o tratamento de: gripe, febre, tosse, dor de dente, queimaduras, infecção urinária, feridas e desordens intestinais (diarreia, dor de estômago) foi alcançada. No total, foram eleitas as 11 plantas principais utilizadas no cotidiano dessa população, geralmente na forma de chá (decoção), ingerida várias vezes ao longo do dia até o desaparecimento dos sintomas. As plantas foram identificadas e um testemunho depositado no Herbário da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (ICN).

A preparação dos extratos foi realizada conforme descrito pelos indígenas, pois acreditamos ser o método mais adequado quando se trata de estudo etnofarmacológico, a fim de mimetizar o uso tradicional das plantas coletadas (RÍOS e RECIO, 2005; COS *et al.*, 2006). Sendo assim, a extração aquosa de todas as plantas foi realizada.

Para a avaliação das atividades antibiótica e antibiofilme, foram utilizadas *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 e *Staphylococcus epidermidis* ATCC 35984, que são modelos de bactérias gram-negativa e gram-positiva, respectivamente, de formação de biofilme. Além disso, também avaliamos sete isolados clínicos produtores de *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase (KPC) provenientes de um hospital de Porto Alegre. Conforme mostra a Tabela 2, do Capítulo 1, essas bactérias produtoras de KPC apresentam um perfil de resistência para diferentes classes de antibióticos (aminoglicosídeos, carbapenêmicos, cefalosporinas e quinolonas). Ainda, para estes isolados clínicos, foi realizado ensaio de formação de biofilme, pelo qual se constatou que cinco entre os sete isolados eram fortes produtores, um isolado apresentou moderada formação e outro isolado apresentou fraca formação de biofilme. A respeito da habilidade de isolados produtores de KPC formarem biofilme, dentro do nosso conhecimento, não existe relato na literatura, fazendo desta a primeira investigação.

Para a avaliação da atividade antiparasitária, foram utilizados sete isolados diferentes de *Trichomonas vaginalis*: isolados padrões 30236 e 30238 ATCC; três isolados clínicos frescos de pacientes mulheres; e dois isolados clínicos frescos de pacientes masculinos, todos oriundos do Laboratório de Análises Clínicas e Toxicológicas, Faculdade de Farmácia, UFRGS. Apesar de nenhuma das plantas adquiridas do cotidiano da tribo Mbyá-Guarani serem utilizadas especificamente para o tratamento de doenças sexualmente transmissíveis, todas elas foram testadas contra os trofozoítos de *T. vaginalis*, porque as plantas selecionadas são utilizadas contra os sintomas de doenças infecciosas, que podem ser tanto bacterianas, quanto parasitárias.

Dentre os 11 extratos aquosos das plantas avaliadas para a atividade antibiótica, antibiofilme e antiparasitária, somente três não apresentaram efeitos importantes contra os patógenos testados em nossas condições de ensaio. São elas: folhas de *Citrus reticulata*, folhas de *Aloe arborescens* e partes aéreas de *Rhipsalis baccifera*. Estas plantas são utilizadas pela tribo Mbyá-Guarani para: vômitos, queimadura e feridas, respectivamente.

A planta que apresentou expressivas atividades antibiótica, antibiofilme e antiparasitária foi a *Campomanesia xanthocarpa*. As folhas de *C. xanthocarpa*, conhecida popularmente como guabiroba, são utilizadas pelos indígenas Mbyá-

Guarani para distúrbios intestinais, como dor de estômago e diarreia causada por 'tacho' – parasitos na linguagem Mbyá. O extrato aquoso de *C. xanthocarpa* deve ser destacado, pois apresentou atividade antibiofilme e antibiótica, tanto para *S. epidermidis*, *P. aeruginosa*, quanto para alguns isolados produtores de KPC. Na concentração de 4,0 mg/mL, o extrato aquoso inibiu em pelo menos 50% a formação de biofilme de *S. epidermidis*, *P. aeruginosa* e de três isolados produtores de KPC. Nesta mesma concentração, apresentou 100% de atividade antibiótica contra *Enterobacter cloacae* produtor de KPC e também inibiu em pelo menos 50% o crescimento de bactérias planctônicas de outros dois isolados produtores de KPC, além de *P. aeruginosa* e *S. epidermidis*. Além destas atividades, o extrato aquoso das folhas de *C. xanthocarpa* reduziu, em média, 96% da viabilidade dos trofozoítos de todos os isolados de *T. vaginalis* testados. Através de uma curva cinética de crescimento, observou-se que a atividade ocorre em somente 4 horas após incubação com o parasito. Este extrato demonstrou ser promissor, pois não apresentou atividade hemolítica contra eritrócitos humanos, sugerindo fortemente que o mecanismo de ação responsável pelo efeito citotóxico não envolve rompimento de membrana e também não apresenta toxicidade às células de mamíferos. Desta forma, a medicina tradicional indígena favoreceu o direcionamento para a avaliação desta planta, uma vez que é utilizada contra distúrbios intestinais, de origem bacteriana e parasitária.

Ainda contra *T. vaginalis*, as folhas de *Verbena* sp. também apresentaram importante atividade, conforme apresentada no Capítulo 2. As folhas de *Verbena* sp. são utilizadas pela população indígena como antipiréticas. Assim como observado em *C. xanthocarpa*, o extrato aquoso de *Verbena* sp. demonstrou 100% de citotoxicidade contra os trofozoítos dos diferentes isolados de *T. vaginalis*, em apenas 4 horas de incubação. Da mesma maneira, não apresentou atividade hemolítica contra eritrócitos humanos. Além deste notório efeito, observou-se ainda que esta planta possui atividades antibiofilme contra um isolado bacteriano produtor de KPC e também contra *S. epidermidis*, e atividade antibiótica expressiva contra outros dois isolados produtores de KPC. Mais uma vez, o conhecimento indígena comprova ser uma ferramenta promissora na busca por novas estratégias antimicrobianas, contribuindo para o combate de patógenos resistentes, como por exemplo, os isolados produtores de KPC.

O extrato das hastes de *Maytenus ilicifolia*, conhecida como espinheira-santa, apresentou atividades antibiofilme contra *Enterobacter cloacae* e *Serratia marcescens*, ambos produtores de KPC e fortemente produtores de biofilme. Além disso, apresentou atividade antibiótica importante contra todos os isolados produtores de KPC, incluindo, abolição total das células planctônicas para o isolado *Enterobacter cloacae* (KPC 10). O uso das hastes de *M. ilicifolia* pelos indígenas é distinto, uma vez que é comum o uso das folhas desta planta. Sendo assim, esta planta que é utilizada para o tratamento de infecção urinária e cólica menstrual pelos Mbyá-Guarani, forneceu atividades inéditas e promissoras desta espécie.

O extrato das partes aéreas de *Bidens pilosa*, utilizada para desordens menstruais pelos indígenas, apresentou atividade antibiofilme contra três isolados produtores de KPC e também contra *S. epidermidis*. A atividade antibiótica foi verificada contra dois isolados produtores de KPC e novamente contra *S. epidermidis*. Além disso, esta planta apresentou 100% de atividade anti-*T. vaginalis*, contra o isolado 30236. A atividade antibiótica desta espécie já foi comprovada por estudos anteriores, mas este é o primeiro relato de atividade antibiofilme e antiparasitária. A raiz de *Trichilia* sp. é utilizada pela população Mbyá-Guarani para dor de dente. O extrato aquoso desta raiz inibiu completamente o crescimento bacteriano de *S. epidermidis* e permitiu apenas 15% de formação de biofilme deste patógeno. Um fato curioso, é que este extrato apresentou maior atividade contra isolados clínicos de *T. vaginalis* provenientes de pacientes masculinos. Ainda, as folhas de *Coix lacryma-jobi* e *Citrus limonium* inibiram a formação de biofilme de um isolado produtor de KPC.

Dentre todas as contribuições do conhecimento Mbyá-Guarani, destacamos, sem dúvida, a indicação da planta *Luehea divaricata*. As cascas desta árvore, conhecida popularmente como açoita-cavalo, são utilizadas pelos indígenas para o tratamento de tosse com grande acúmulo de secreção. O extrato aquoso das cascas de *L. divaricata* apresentou a maior atividade contra a formação de biofilme - tanto de *P. aeruginosa* quanto de *S. epidermidis*, conforme relatado no Capítulo 3. Portanto, esta planta foi submetida à extração com outros solventes, a fim de obtermos acesso a um número maior de compostos (RÍOS e RECIO, 2005; SAMY e GOPALAKRISHNAKONE, 2010). Para tanto, realizamos adicionalmente a extração

com solventes de diferentes polaridades, como água:etanol (50:50), acetonitrila e acetato de etila. Curiosamente, de maneira geral, não houve diferença entre as atividades de cada extrato. Tal resultado nos remete a concluir, mais uma vez, que o conhecimento indígena é importante para o rastreamento inicial das atividades biológicas, visto que esse extrato é utilizado sob a forma de chá. Neste sentido, uma investigação aprofundada dos possíveis modos de ação de *L. divaricata* na formação de biofilmes, tornou-se interessante. Para este fim, optou-se pela avaliação do extrato hidroalcoólico, porque estes solventes possuem a capacidade de extrair uma vasta gama de compostos de plantas e por isso vêm revelando atividades farmacológicas muito eficazes, incluindo a antimicrobiana (SAMMY e GOPALAKRISHNAKONE, 2010).

A curva cinética de crescimento revelou que este extrato inicia a inibição da adesão bacteriana de ambos os patógenos após 3 horas de incubação, conforme apresentado na Figura 1 do Capítulo 3. Além disso, estes resultados levam a conclusão que o extrato age diferentemente em cada bactéria, pois a inibição da formação de biofilme de *P. aeruginosa* provavelmente ocorre em consequência da morte bacteriana. Observa-se que a formação de biofilme nas primeiras horas é menor devido à atividade antibiótica, porque, com o passar do tempo, o extrato já não age sob as células planctônicas, então as bactérias voltam a formar biofilme normalmente, caracterizando uma atividade bacteriostática do extrato. Já na formação de biofilme de *S. epidermidis* a inibição da adesão bacteriana não depende da atividade antibiótica do mesmo.

Estes fatos foram evidenciados pela microscopia eletrônica de varredura (MEV) em 3, 12 e 24 horas de incubação (Figuras 2 e 3 do Capítulo 3). A formação de biofilme de *P. aeruginosa* e *S. epidermidis* demonstrou um perfil característico, na ausência dos extratos, com produção de matriz e um típico fenótipo de biofilme maduro após 24 horas. Em contraste, os biofilmes tratados com extrato hidroalcoólico de *L. divaricata* apresentaram uma expressiva diminuição das células aderidas. Apesar de a curva cinética demonstrar que em 24 horas a *P. aeruginosa* volta a ter habilidade de formar biofilme, por MEV pode-se observar as bactérias em menor número, deformadas e a ausência da formação de matriz, quando comparadas com o controle. No biofilme de *S. epidermidis* tratado com o extrato existem poucas bactérias e as que foram observadas apresentavam-se alteradas

morfologicamente. Este tipo de mecanismo de inibição do biofilme - sem efeito no crescimento bacteriano - parece ser promissor. Isso porque o mecanismo de morte celular eventualmente torna as células bacterianas resistentes aos antibióticos (BJARNSHOLT e GIVSKOV, 2007). Atualmente, este conceito inovador busca terapias que comprometam a adesão bacteriana e a formação de biofilme, pois exploram um mecanismo de ação diferente do convencional. Além destas avaliações, o extrato hidroalcoólico foi submetido ao ensaio hemolítico, demonstrando não ser tóxico aos eritrócitos humanos. A atividade antiparasitária do extrato aquoso de *L. divaricata* também foi observada, diferentemente para cada isolado. Concluímos então que o uso desta planta, para tosse com secreção, corrobora com as atividades antibiofilme observadas.

A abordagem etnofarmacológica empregada neste estudo comprova o valor incomensurável dos conhecimentos tradicionais. Sendo assim, existe a responsabilidade de proteção e armazenamento destas informações das comunidades indígenas locais, além do manejo do meio ambiente, que certamente beneficiarão de alguma forma a sociedade.

V. Conclusões Gerais

Os resultados apresentados nesta dissertação permitem as seguintes conclusões:

- 1- A etnofarmacologia indígena possui um papel importante na busca de plantas com atividade antibiótica, antibiofilme e antiparasitária contra importantes patógenos;
- 2- Na maioria dos casos, a informação tradicional teve uma comprovação científica relacionada;
- 3- Algumas plantas medicinais testadas apresentaram atividade antibiofilme e antibiótica contra isolados produtores de KPC, sendo este fato inédito na literatura atual;
- 4- A planta *Luehea divaricata* possui uma promissora atividade antibiofilme para *Pseudomonas aeruginosa* e *Staphylococcus epidermidis*;
- 5- As plantas *Campomanesia xanthocarpa* e *Verbena* sp. possuem atividade antibiótica, antibiofilme e anti-*Trichomonas vaginalis*;
- 6- Os extratos ativos não apresentaram atividade hemolítica, indicando uma provável baixa toxicidade às células de mamíferos;
- 7- Entre os estudos iniciais dos possíveis modos de ação dos extratos ativos de *Luehea divaricata*, *Campomanesia xanthocarpa* e *Verbena* sp., podemos, de maneira geral, inferir que as atividades descritas possuem um grande potencial, inclusive em alguns casos, apresentando aspectos distintos dos terapias hoje existentes

VI. Perspectivas

No sentido de avançar no entendimento acerca do mecanismo de ação das plantas que apresentaram atividade antibiótica, antibiofilme e antiparasitária, bem como o fracionamento bioguiado dos mesmos, algumas perspectivas são sugeridas:

1. Fracionamento bioguiado dos extratos das plantas: *Luehea divaricata*, *Campomanesia xanthocarpa* e *Maytenus ilicifolia*;
2. Isolamento e elucidação da(s) molécula(s) envolvidas nas atividades biológicas;
3. Investigação do mecanismo de ação das moléculas bioativas

VII. Referências

ABRAHAM, I.S.V.; PALANI, A.; RAMASWAMY, B.R.; SHUNMUGIAH, K.P.; ARUMUGAM, V.R. Antiquorum sensing and antibiofilm potential of *Capparis spinosa*. *Archives of Medical Research*, v. 42, p. 658-668, 2011.

ALI, V.; NOZAKI, T. Current Therapeutics, Their problems, and sulfur-containing-amino-acid metabolism as a novel target against infections by "amitochondriate" protozoan parasites. *Clinical Microbiology Reviews*, v. 20, n.1, p. 164-187, 2007.

ANDRADE, L.N.; CURIAO, T.; FERREIRA, J.C.; LONGO, J.M.; CLÍMACO, E.C.; MARTINEZ, R.; BELLISSIMO-RODRIGUES, F.; BASILE-FILHO, A.; EVARISTO, M.A.; DEL PELOSO, P.F.; RIBEIRO, V.B.; BARTH, A.L.; PAULA, M.C.; BAQUERO, F.; CANTÓN, R.; DARINI, A.L.; COQUE, T.M. Dissemination of bla_{KPC-2} by the spread of *Klebsiella pneumoniae* clonal complex 258 clones (ST258, ST11, ST437) and plasmids (IncFII, IncN, IncL/M) among Enterobacteriaceae species in Brazil. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, v. 55, p. 3579-3583, 2011.

ANTHONY, J.P.; FYFE, L.; SMITH, H. Plant active components - a resource for antiparasitic agents? *Trends in Parasitology*, v. 21, p. 462-468, 2005.

ARNOLD, R.S.; THOM, K.A.; SHARMA, S.; PHILLIPS, M.; JOHNSON, K.J.; MORGAN, D.J. Emergence of *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase-producing bacteria. *Southern Medical Journal*, v. 104, n.1, p. 40-45, 2011.

ARROYO, R.; ENGBRING, J.; ALDERETE, J. F. Molecular basis of host epithelial cell recognition by *Trichomonas vaginalis*. *Molecular Microbiology*, v.6, n.7, p.853-862, 1992.

ARTINI, M.; PAPA, R.; BARBATO, G.; SCOARUGHI, G.L.; CELLINI, A.; MORAZZONI, P.; BOMBARDELLI, E.; SELAN, L. Bacterial biofilm formation inhibitory activity revealed for plant derived natural compounds. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, v. 15, n. 2, p. 920-926, 2012.

AYBAR, Y.; OZARAS, R.; BESIRLI, K.; ENGIN, E.; KARABULUT, E.; SALIHOGLU, T.; METE, B.; TABAK, F.; MERT, A.; TAHAN, G.; YILMAZ, M.H.; OZTURK, R. Efficacy of tigecycline and vancomycin in experimental catheter-related *Staphylococcus epidermidis* infection: microbiological and electron microscopic analysis of biofilm. *The International Journal of Antimicrobial Agents*, v. 39, p. 338-42, 2012.

BAKARE, R. A.; ASHIRU, J. O.; ADEYEMI-DORO, F. A.; EKWEOZOR, C. C.; ONI, A. A.; OKESOLA, A. O.; ADEBAYO, J. A. Non-gonococcal urethritis (NGU) due to *Trichomonas vaginalis* in Ibadan. *West African Journal of Medicine*, v.18, n.1, p.64-68, 1999.

BEIRÃO, E.M.; FURTADO, J.J.; GIRARDELLO, R.; FERREIRA FILHO, H.; GALES, A.C. Clinical and microbiological characterization of KPC-producing *Klebsiella pneumoniae* infections in Brazil. *The Brazilian Journal of Infectious Diseases*, v. 15, n.1, p. 69-73, 2011.

BENCHIMOL, M. Trichomonads under microscopy. *Microscopy and Microanalysis*, v. 10, p. 528-550, 2004.

BERGAMASCHI, M.A. Processos e práticas de escolarização nas aldeias Guarani. UFRGS, 2005. p. 1-274, Programa de Pós-Graduação em Educação da Faculdade de Educação da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2005.

BJARNSHOLT, T.; GIVSKOV, M. Quorum-sensing blockade as a strategy for enhancing host defenses against bacterial pathogens. *Philosophical Transactions*, v. 362, p. 1213–1222, 2007.

BORST, P.; OUELLETTE, M. New mechanisms of drug resistance in parasitic protozoa. *Annual Review of Microbiology*, v.49, n.1, p.427-460, 1995.

BREIDENSTEIN, E.B.; DE LA FUENTE-NÚÑEZ, C.; HANCOCK, R.E. *Pseudomonas aeruginosa*: all roads lead to resistance. *Trends Microbiology*, v. 19, p. 419-426, 2011.

BUENO, N.R.; CASTILHO, R.O.; COSTA, R.B.; POTT, A.; POTT, V.J.; SCHEIDT, G.N.; BATISTA, M.S. Medicinal plants used by the Kaiowá and Guarani indigenous populations in the Caarapó Reserve, Mato Grosso do Sul, Brazil. *Acta Botanica Brasílica*, v. 19, p. 39-44, 2005.

BURMØLLE, M.; THOMSEN, T.R.; FAZLI, M.; DIGE, I.; CHRISTENSEN, L.; HOMØE, P.; TVEDE, M.; NYVAD, B.; TOLKER-NIELSEN, T.; GIVSKOV, M.; MOSER, C.; KIRKETERP-MØLLER, K.; JOHANSEN, H.K.; HØIBY, N.; JENSEN, P.Ø.; SØRENSEN, S.J.; BJARNSHOLT, T. Biofilms in chronic infections - a matter of opportunity - monospecies biofilms in multispecies infections. *FEMS Immunology and Medical Microbiology*, v. 59, p. 324-336, 2010.

BUSH, K. Alarming β -lactamase-mediated resistance in multidrug-resistant Enterobacteriaceae. *Current Opinion in Microbiology*, v. 13, n. 5, p. 558-564, 2010.

CALIXTO, J.B. Efficacy, safety, quality control, marketing and regulatory guidelines for herbal medicines (phytoterapeutic agents). *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, v. 33, p. 179-189, 2000.

CALZADA, F.; YÉPEZ-MULIA, L.; TAPIA-CONTRERAS, A. Effect of Mexican medicinal plant used to treat trichomoniasis on *Trichomonas vaginalis* trophozoites. *Journal of Ethnopharmacology*, v. 113, p. 248-251, 2007.

CHEN, X.; SCHAUDER, S.; POTIER, N.; VAN DORSSELAER, A.; PELCZER, I.; BASSLER, B.L.; HUGHSON, F.M. Structural identification of a bacterial quorum-sensing signal containing boron. *Nature*, v. 415: p. 545-549, 2002.

CHERPES, T. L.; WIESENFELD, H. C.; MELAN, M. A.; KANT, J. A.; COSENTINO, L. A.; MEYN, L. A.; HILLIER, S. L. The associations between pelvic inflammatory disease, *Trichomonas vaginalis* infection, and positive herpes simplex virus type 2 serology. *Sexually Transmitted Diseases*, v. 33, n. 12, p. 747-752, 2006.

CORDELL, G. A. Changing strategies in natural products chemistry. *Phytochemistry*, v. 40, p. 1585-1612, 1995.

CORDELL, G.A.; QUINN-BEATTIE, M.L. Unpublished results from the NAPRALERT database. University of Illinois at Chicago, 2005.

COS, P.; VLIETINCK, A.J.; BERGHE, D.V.; MAES, L. Anti-infective potential of natural products: how to develop a stronger in vitro 'proof-of-concept'. *Journal of Ethnopharmacology*, v. 106, p. 290-302, 2006.

COSTERTON, J.W.; STEWART, P.S.; GREENBERG, E.P. Bacterial biofilms: a common cause of persistent infections. *Science*, v. 284, n. 5418, p. 1318-1322, 1999.

COTCH, M. F.; PASTOREK II, J. G. N.; NUGENT, R. P.; HILLIER, S. L.; GIBBS, R. S.; MARTIN, D. H.; ESCHENBACH, D. A.; EDELMAN, R.; CAREY, J. C.; REGAN, J. A.; KROHN, M. A.; KLEBANOFF, M. A.; RAO, A. V.; RHOADS, G. 99 G. *Trichomonas vaginalis* associated with low birth weight and preterm delivery. The vaginal infections and prematurity study group. *Sexually Transmitted Diseases*, v. 24, p. 353-360, 1997.

COUTINHO, D.F.; TRAVASSOS, L.M.A.; AMARAL, F.M.M. Estudo etnobotânico de plantas medicinais utilizadas em comunidades indígenas no estado do Maranhão – Brasil. *Visão Acadêmica*, v. 3, p. 7-12, 2002.

CUDMORE, S.L.; GARBER, G.E. Prevention or treatment: the benefits of *Trichomonas vaginalis* vaccine. *Journal of Infection and Public Health*, v. 3, n. 2, p. 47-53, 2010.

DAVIES, D. Understanding biofilm resistance to antimicrobial agents. *Nature Reviews Drug Discovery*, v. 2, p. 114-122, 2003.

DE CARLI, G. A. *Parasitologia Clínica – Seleção de Métodos e Técnicas de Laboratório para Diagnóstico das Parasitoses Humanas*. São Paulo: Editora Atheneu, 2007. v. 01. 907 p.

DIGGLE, S.P.; GRIFFIN, A.S.; CAMPBELL, G.S.; WEST, S.A. Cooperation and conflict in quorum-sensing bacterial populations. *Nature*, v.15, p 411-414, 2007.

DONLAN, R.M.; COSTERTON, J,W. Biofilms: survival mechanisms of clinically relevant microorganisms. *Clinical Microbiology Reviews*, v. 15, p.167-193, 2002.

ELISABETSKY, E. Etnofarmacologia como ferramenta na busca de substâncias ativas. In: SIMÕES, C. M. O; SCHENKEL, E. P.; GOSMANN, G.; MELLO, J. C. P.; MENTZ, L. A.; PETROVICK, P. R. *Farmacognosia: da planta ao medicamento*. 2.ed. Editora UFRGS/UFSC, Porto Alegre, RS; Florianópolis, SC. 2001. 87-99, 2000.

ELISABETSKY, E. Etnofarmacologia. *Ciência e Cultura*, v. 55, p. 35-36, 2003.

FICHOROVA, R. N. Impact of *Trichomonas vaginalis* infection on innate immune responses and reproductive outcome. *Journal of Reproductive Immunology*, v. 83, n. 1-2, p. 185-189, 2009.

FRASSON, A.P.; DOS SANTOS, O.; DUARTE, M.; TRENTIN, D.S.; GIORDANI, R.B.; DA SILVA, A.G.; DA SILVA, M.V.; TASCA, T.; MACEDO, A.J. First report of anti-*Trichomonas vaginalis* activity of the medicinal plant *Polygala decumbens* from

the Brazilian semi-arid region, Caatinga. *Parasitology Research*, v. 110, p. 2581-2587, 2012.

FUNDAÇÃO NACIONAL DO ÍNDIO (FUNAI). Disponível em <http://www.funai.gov.br>. Acesso em março de 2011.

FUQUA, C.; GREENBERG, E.P. Self perception in bacteria: quorum sensing with acylated homoserine lactones. *Current Opinion in Microbiology*, v. 2, p. 183-189, 1998.

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

GARRETT, T.R.; BHAKOO, M.; ZHANG, Z. Bacterial adhesion and biofilms on surfaces. *Progress in Natural Science*, v. 18, n. 1, p. 1049-1056, 2008.

GILBERT, P.; COLLIER, P.J.; BROWN, M.R.W. Influence of growth rate on susceptibility to antimicrobial agents: biofilms, cell cycle, dormancy and stringent response. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, v. 34, n. 10, p. 1865-1868, 1990.

GIORDANI, R.B.; VIEIRA, Pde. B.; WEIZENMANN, M.; ROSEMBERG, D.B.; SOUZA, A.P.; BONORINO, C.; DE CARLI, G.A.; BOGO, M.R.; ZUANAZZI, J.A.; TASCA, T. Candimine-induced cell death of the amitochondriate parasite *Trichomonas vaginalis*. *Journal of Natural Products*, v. 73, p. 2019-2023, 2010.

GIORDANI, R.B.; VIEIRA, P.de B.; WEIZENMANN, M.; ROSEMBERG, D.B.; SOUZA, A.P.; BONORINO, C.; DE CARLI, G.A.; BOGO, M.R.; ZUANAZZI, J.A.; TASCA, T. Lycorine induces cell death in the amitochondriate parasite, *Trichomonas vaginalis*, via an alternative non-apoptotic death pathway. *Phytochemistry*, v. 72, p. 645-650, 2011a.

GIORDANI, R.B.; ARAÚJO, D.P.; DUARTE, M.; ZUANAZZI, J.A.; TASCA, T.; DE ALMEIDA, M.V. Anti-protozoal activity of diamine derivatives. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, v. 65, p. 60-62, 2011b.

GRODSTEIN, F.; GOLDMAN, M. B.; CRAMER, D. W. Relation of Tubal Infertility to History of Sexually Transmitted Diseases. *American Journal of Epidemiology*, v. 137, n. 5, p. 577-584, 1993.

GUPTA, N.; LIMBAGO, B.M.; PATEL, J.B.; KALLEN, A.J. Carbapenem-resistant Enterobacteriaceae: epidemiology and prevention. *Clinical Infectious Diseases*, v. 53, p. 60-67, 2011.

GURIB-FAKIM, A. Medicinal plants: Traditions of yesterday and drugs tomorrow. *Molecular Aspects of Medicine*, v. 27, p. 1-93, 2006.

HEIJERMAN, H. Infection and inflammation in cystic fibrosis: a short review. *Journal of Cystic Fibrosis*, v. 4, p.3-5, 2005.

HIRSCH, E.B.; TAM, V.H. Detection and treatment options for *Klebsiella pneumoniae* carbapenemases (KPCs): an emerging cause of multidrug-resistant infection. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, v. 65, p. 1119-1125, 2010.

HRDÝ, I.; CAMMACK, R.; STOPKA, P.; KULDA, J.; TACHEZY, J. Alternative pathway of metronidazole activation in *Trichomonas vaginalis* hydrogenosomes. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, v. 49, p. 5033-5036, 2005.

HOBBS, M.M.; KAZEMBE, P.; REED, A.W.; MILLER, W.C.; NKATA, E.; ZIMBA, D.; DALY, C.C.; CHAKRABORTY, H.; COHEN, M.S.; HOFFMAN, I. *Trichomonas vaginalis* as a cause of urethritis in Malawian men. *Sexually Transmitted Diseases*, v. 26, n.7, p.381-387, 1999.

HONIGBERG, B.M.; BRUGEROLLE, G. Structure. In: HONIGBERG, B. M., ed. *Trichomonads parasitic in humans*. New York: Springer-Verlag, 1990. p. 5-35.

INSTITUTO DE ESTUDOS CULTURAIS E AMBIENTAIS (IECAM). Disponível em <http://www.iecam.org.br/>. Acessado em junho de 2012.

JABBOURI, S.; SADOVSKAYA, I. Characteristics of the biofilm matrix and its role as a possible target for the detection and eradication of *Staphylococcus epidermidis* associated with medical implant infections. *FEMS Immunology and Medical Microbiology*, v. 59, p. 280-291, 2010.

JOHNSTON, V.J.; MABEY, D.C. Global epidemiology and control of *Trichomonas vaginalis*. *Current Opinion in Infectious Disease*, v. 21, p. 56-64, 2008.

KATSIKOIANNI, M; MISSIRLIS, Y.F. Concise review of mechanisms of bacterial adhesion to biomaterials and techniques used in estimating bacteria-material interactions. *European Cells and Materials*, v. 8, p. 37-57, 2004.

KIM, H.S. Do not put too much value on conventional medicines. *Journal of Ethnopharmacology*, v. 100, p. 37-39, 2005.

KLEBANOFF, M. A.; CAREY, J. C.; HAUTH, J. C.; HILLIER, S. L.; NUGENT, R. P.; THOM, E. A.; ERNEST, J. M.; HEINE, R. P.; WAPNER, R. J.; TROUT, W.; MOAWAD, A.; MODOVNIK, M.; SIBAI, B. M.; DORSTEN, J. P. V.; DOMBROWSKI, M. P.; O'SULLIVAN, M. J.; VARNER, M.; LANGER, O.; MCNELLIS, D.; ROBERTS, J. M.; LEVENO, K. J. Failure of metronidazole to prevent preterm delivery among pregnant women with asymptomatic *Trichomonas vaginalis* infection. *New England Journal of Medicine*, v. 345, n. 7, p. 487-493, 2001.

KOEHN, F.E.; CARTER, G.T. The evolving role of natural products in drug discovery. *Nature Reviews Drug Discovery*, v. 4, p. 206-220, 2005.

KULDA, J. Trichomonads, hydrogenosomes and drug resistance. *International Journal for Parasitology*, v. 29, p. 199-212, 1999.

KUŹMA, Ł.; RÓZALSKI, M.; WALENCKA, E.; RÓZALSKA, B.; WYSOKIŃSKA, H. Antimicrobial activity of diterpenoids from hairy roots of *Salvia sclarea* L.: salvipisone as a potential anti-biofilm agent active against antibiotic resistant Staphylococci. *Phytomedicine*, v. 14, p. 31-35, 2007.

LEHKER, M. W.; ALDERETE, J. F. Biology of trichomonosis. *Current Opinion in Infectious Diseases*, v. 13, n. 1, p. 37-45, 2000.

LEITSCH, D.; KOLARICH, D.; BINDER, M.; STADLMANN, J.; ALTMANN, F.; DUCH, D.; DUCHÉNE, M. *Trichomonas vaginalis*: metronidazole and other nitroimidazole drugs are reduced by the flavin enzyme thioredoxin reductase and disrupt the cellular redox system. Implications for nitroimidazole toxicity and resistance. *Molecular Microbiology*, v. 72, p. 518-536, 2009.

LEVINE, W. C.; POPE, V.; BHOOMKAR, A.; TAMBE, P.; LEWIS, J. S.; ZAIDI, A. A.; FARSHY, C. E.; MITCHELL, S.; TALKINGTON, D. F. Increase in endocervical CD4 lymphocytes among women with nonulcerative sexually transmitted diseases. *Journal of Infectious Diseases*, v. 177, n. 1, p. 167-174, 1998.

LI, J.W.; VEDERAS, J.C. Drug discovery and natural products: end of an era or an endless frontier? *Science*, v. 325, p. 161-165, 2009.

LUMSDEN, W. H.; ROBERTSON, D. H.; HEYWORTH, R.; HARRISON, C. Treatment failure in *Trichomonas vaginalis* vaginitis. *Genitourinary Medicine*, v. 64, n. 4, p. 217-218, 1988.

MARRIE, T.J.; NELLIGAN, J.; COSTERTON, J.W. A scanning and transmission electron microscopic study of an infected endocardial pacemaker lead. *Circulation*, v. 66, p. 1339-1341, 1982.

MC CLELLAND, R. S.; SANGARÉ, L.; HASSAN, W. M.; LAVREYS, L.; MANDALIYA, K.; KIARIE, J.; NDINYA-ACHOLA, J.; JAOKO, W.; BAETEN, J. M. Infection with *Trichomonas vaginalis* increases the risk of HIV-1 acquisition. *Journal of Infectious Diseases*, v. 195, n. 5, p. 698-702, 2007.

MORAN, K. Indigenous peoples and local communities embodying traditional lifestyles" definitions under Article 8(j) of the Convention on Biological Diversity. *Ethnomedicine and Drug Discovery*, v. 1, p. 181-189, 2002.

MOREAU-MARQUIS, S.; STANTON, B.A.; O'TOOLEB, G.A. *Pseudomonas aeruginosa* biofilm formation in the cystic fibrosis airway. A short review. *Pulmonary Pharmacology & Therapeutics*, v. 21, n. 4, p. 595-599, 2008.

NEWMAN, D.J.; CRAGG, G.M. Natural products as sources of new drugs over the 30 years from 1981 to 2010. *Journal of Natural Products*, v. 75, p. 311-335, 2012.

NORDMANN, P.; CUZON, G.; NAAS, T. The real threat of *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase-producing bacteria. *The Lancet Infectious Diseases*, v. 9, p. 228-236, 2009.

NORDMANN, P.; DORTET, L.; POIREL, L. Carbapenem resistance in Enterobacteriaceae: here is the storm! *Trends in Molecular Medicine*, v. 18, p. 263-272, 2012.

NWEZE, E.I.; MOUNEKE, G.N. *Trichomonas vaginalis* in HIV/AIDS subjects in Nigeria. *Asian Pacific Journal of Tropical Medicine*, v. 1, n. 4, p. 282-286, 2011.

OTTO, M. *Staphylococcus epidermidis* — the 'accidental' pathogen. *Nature Reviews Microbiology*, v. 7, p. 555-567, 2009

PATEL, N.; HARRINGTON, S.; DIHMES, A.; WOO, B.; MASOUD, R.; MARTIS, P.; FIORENZA, M.; GRAFFUNDER, E.; EVANS, A.; MCNUTT, L.A.; LODISE, T.P. Clinical epidemiology of carbapenem-intermediate or -resistant Enterobacteriaceae. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, v. 66, p. 1600-1608, 2011.

PATWARDHAN, B. Ethnopharmacology and drug discovery. *Journal of Ethnopharmacology*, v. 100, p. 50-52, 2005.

PETRIN, D.; DELGATY, K.; BHATT, R.; GARBER, G. Clinical and microbiological aspects of *Trichomonas vaginalis*. *Clinical Microbiology Reviews*, v. 11, p. 300-317, 1998.

REGO, F.L.H.; BRAND, A.J.; COSTA, R.B. Genetic resources, biodiversity, traditional knowledge Guarani Kaiowá and local development. *Interações*, v. 11, p. 55-69, 2010.

REIN, M. F. Clinical manifestations of urogenital trichomoniasis in women. In: HONIGBERG, B. M., ed. *Trichomonads parasitic in humans*. New York: Springer-Verlag, 1990. p. 225-234.

RÍOS, J.L.; RECIO, M.C. Medicinal plants and antimicrobial activity. *Journal of Ethnopharmacology*, v. 100, p.80-84, 2005.

SAITO, S.T.; TRENTIN, D.S.; MACEDO, A.J.; PUNGARTNIK, C.; GOSMANN, G.; SILVEIRA, J.D.; GUECHEVA, T.N.; HENRIQUES, J.A.; BRENDEL, M. Bioguided fractionation shows *Cassia alata* extract to inhibit *Staphylococcus epidermidis* and *Pseudomonas aeruginosa* growth and biofilm formation. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, v. 2012, p. 1-13, 2012.

SAMY, P.R.; GOPALAKRISHNAKONE, P. Therapeutic Potential of Plants as Antimicrobials for Drug Discovery. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, v. 7, p. 283-294, 2010.

SCHWEBKE, J. R.; BURGESS, D. Trichomoniasis. *Clinical Microbiology Reviews*, v. 17, n. 4, p. 794-803, 2004.

SCHWEBKE, J.R.; BARRIENTES, F.J. Prevalence of *Trichomonas vaginalis* isolates with resistance to metronidazole and tinidazole. *Antimicrobial Agents Chemotherapy*, v. 50, n. 12, p. 4209-4210, 2006.

SOUZA, J.O.C.; MORAES, C.E.N.; PIRES, D.M.; MORINICO, J.C.P.; ARNT, M.A. *Tava Miri São Miguel Arcanjo, Sagrada Aldeia de Pedra: os Mbyá-Guarani nas Missões*. Porto Alegre: 12°SR – IPHAN, 2007, v. 1, 58p.

SUTCLIFFE, S.; NEWMAN, S.B.; HARDICK, A.; GAYDOS, C.A. Prevalence and correlates of *Trichomonas vaginalis* infection among female US federal prison inmates. *Sexually Transmitted Diseases*, v. 37, p. 585-590, 2010.

TAGA, M.E.; BASSLER, B.L. Chemical communication among bacteria. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, v. 100, p. 14549-14554, 2003.

- TAGANNA, J.C.; QUANICO, J.P.; PERONO, R.M.; AMOR, E.C.; RIVERA, W.L. Tannin-rich fraction from *Terminalia catappa* inhibits quorum sensing (QS) in *Chromobacterium violaceum* and the QS-controlled biofilm maturation and LasA staphylolytic activity in *Pseudomonas aeruginosa*. *Journal of Ethnopharmacology*, v. 134, p. 865-871, 2011.
- TRENTIN, D.D.; GIORDANI, R.B.; ZIMMER, K.R.; DA SILVA, A.G.; DA SILVA, M.V.; CORREIA, M.T.; BAUMVOL, I.J.; MACEDO, A.J. Potential of medicinal plants from the Brazilian semi-arid region (Caatinga) against *Staphylococcus epidermidis* planktonic and biofilm lifestyles. *Journal of Ethnopharmacology*, v. 137, p. 327-335, 2011.
- TRETER, J.; MACEDO, A.J. Catheters: a suitable surface for biofilm formation. In: Méndez-Vilas A (Ed.), *Science against microbial pathogens: communicating current research and technological advances*. Badajoz, Formatex Research Center, pp. 835-842, 2011.
- UPRETY, Y.; ASSELIN, H.; BOON, Ek.; YADAV, S.; SHRESTHA, K.K. Indigenous use and bio-efficacy of medicinal plants in the Rasuwa District, Central Nepal. *Journal of Ethnobiology and Ethnomedicine*, v. 6, p. 3, 2010.
- VAN DER POL, B.; KWOK, C.; PIERRE-LOUIS, B.; RINALDI, A.; SALATA, R. A.; CHEN, P.-L.; VAN DE WIJGERT, J.; MMIRO, F.; MUGERWA, R.; CHIPATO, T.; MORRISON, C. S. *Trichomonas vaginalis* Infection and Human Immunodeficiency Virus Acquisition in African Women. *Journal of Infectious Diseases*, v. 197, n. 4, p. 548-554, 2008.
- VENDRUSCOLO, G.S.; MENTZ, L.A. Levantamento etnobotânico das plantas utilizadas como medicinais por moradores do bairro Ponta Grossa, Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brasil. *Iheringia, Série Botânica*, v. 61, p.83-103, 2006.
- VIEIRA, P.B.; GIORDANI, R.B.; DE CARLI, G.A.; ZUANAZZI, J.A.; TASCA, T. Screening and bioguided fractionation of Amaryllidaceae species with anti-*Trichomonas vaginalis* activity. *Planta Medica*, v. 77, p. 1054-1059, 2011.
- VIIKKI, M.; PUKKALA, E.; NIEMINEN, P.; HAKAMA, M. Gynaecological infections as risk determinants of subsequent cervical neoplasia. *Acta Oncologica*, v. 39, p. 71-75, 2000.
- ZIEBUHR, W.; HENNIG, S.; ECKART, M.; KRÄNZLER, H.; BATZILLA, C.; KOZITSKAYA, S. Nosocomial infections by *Staphylococcus epidermidis*: how a commensal bacterium turns into a pathogen. *The International Journal of Antimicrobial Agents*, v. 28S, p. S14-S20, 2006.
- WANG, X.; YAO, X.; ZHU, Z.; TANG, T.; DAI, K.; SADOVSKAYA, I.; FLAHAUT, S.; JABBOURI, S. Effect of berberine on *Staphylococcus epidermidis* biofilm formation. *The International Journal of Antimicrobial Agents*, v. 34, n. 1, p. 60-66, 2009.
- WELDEGERIMA, B. Review on the importance of documenting ethnopharmacological information on medicinal plants. *African Journal of Pharmacy and Pharmacology*, v. 3, p. 400-403, 2009.

WHO, 2001. Global prevalence and incidence of selected curable sexually transmitted infections. WHO, Geneva, p. 1-120.

Artigos publicados no período de vigência do mestrado:

BRANDELLI, C. L. C., DE CARLI, G. A., MACEDO, A.J., TASCA, T. Intestinal Parasitism And Socio-Environmental Factors - Concerned Data Among Mbyá-Guarani Indians, Porto Alegre, Rs, Brazil.. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo*, v. 54, n.3, p. 119-122, 2012.

DE BRUM VIEIRA, P., BRANDELLI, C. L. C., VERISSIMO, C. M., TASCA, T. Mecanismos específicos de patogenicidade de protozoários de mucosa: *Entamoeba histolytica*, *Giardia lamblia* e *Trichomonas vaginalis*. *Revista HCPA*, v. 32, p. 58-70, 2012.

BRANDELLI, C. L. C., CARGNIN, S. T., WILLERS, D.M.C., OLIVEIRA, K.R.P., TASCA, T. Comparison between spontaneous sedimentation method and Paratest for the diagnosis of intestinal parasitic infections. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, v. 105, p. 604-606, 2011.

Capítulo de livro publicado no período de vigência do mestrado:

BRANDELLI, C. L. C., GIORDANI, R. B., MACEDO, A.J., DE CARLI, G. A., TASCA, T. Indigenous Traditional Medicine: Plants for the Treatment of Diarrhea.. Heinz Mehlhorn. (Org.). *Nature Helps... How Plants and Other Organisms Contribute to Solve Health Problems*. Berlim: Springer-Verlag, 2011, v. 1, p. 1-18.

Aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa da UFRGS:

O projeto referente à este trabalho, intitulado “Análise etnofarmacológica de plantas utilizadas pela tribo indígena Mbyá-Guarani na busca de espécies com atividade contra biofilmes patogênicos e *Trichomonas vaginalis*”, foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da UFRGS, sob o número 21723

Comprovante de encaminhamento do Capítulo I para publicação:

Assunto: Payment request: MS ID 6981491128218796
Data: 2012-10-09 20:20
Remetente: BioMed Central Waivers <waivers@biomedcentral.com>
Para: Alexandre Jose Macedo <alexandre.macedo@ufrgs.br>

Title : Medicinal plants used by a Mbya-Guarani tribe against
infections: activity on KPC-producing isolates and biofilm-forming
bacteria

Authors : Clara Lia Costa Brandelli, Vanessa Bley Ribeiro,
Karine Rigon Zimmer, Afonso Luís Barth, Tiana Tasca and Alexandre
José Macedo

MS ID : 6981491128218796

Journal : Journal of Ethnobiology and Ethnomedicine

Article type: Research

Dear Dr Macedo

This is confirmation that we have received your request for a waiver
of the article-processing charge on the above article.
We will be in contact shortly with a decision.

BioMed Central Waivers
Tel: [+44 \(0\) 20 3192 2013](tel:+442031922013)
email: waivers@biomedcentral.com

--

Alexandre Jose Macedo
[51 3308 5354](tel:+555133085354) ou [51 3308 6082](tel:+555133086082)
<http://www.ufrgs.br/lbdim/>