



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

LUCAS DE PAULA RAMOS

**ATIVIDADE ANTIMICROBIANA E CITOTOXICIDADE
DOS EXTRATOS GLICÓLICOS DE *Pfaffia paniculata* K. E
Juglans regia L.**

2016

LUCAS DE PAULA RAMOS

**ATIVIDADE ANTIMICROBIANA E CITOTOXICIDADE DOS
EXTRATOS GLICÓLICOS DE *Pfaffia paniculata* K. E *Juglans regia* L.**

Dissertação apresentada ao Instituto de Ciência e Tecnologia, Universidade Estadual Paulista (Unesp), Campus de São José dos Campos, como parte dos requisitos para obtenção do título de MESTRE, pelo Programa de Pós-Graduação em BIOPATOLOGIA BUCAL, Área Microbiologia / Imunologia.

Orientadora: Profa. Dra. Graziella Nuernberg Back Brito

São José dos Campos

2016

Instituto de Ciência e Tecnologia [internet]. Normalização de tese e dissertação [acesso em 2016]. Disponível em <http://www.ict.unesp.br/biblioteca/normalizacao>

Apresentação gráfica e normalização de acordo com as normas estabelecidas pelo Serviço de Normalização de Documentos da Seção Técnica de Referência e Atendimento ao Usuário e Documentação (STRAUD).

de Paula Ramos, Lucas

Atividade antimicrobiana e citotoxicidade dos extratos glicólicos de *Pfaffia paniculata* e *Juglans regia* L. / Lucas de Paula Ramos. - São José dos Campos : [s.n.], 2016.

83 f. : il.

Dissertação (Mestrado em Biopatologia Bucal) - Pós-graduação em Biopatologia Bucal - Universidade Estadual Paulista (Unesp), Instituto de Ciência e Tecnologia, São José dos Campos, 2016.

Orientadora: Graziella Nuernberg Back Brito.

1. *Pfaffia paniculata*. 2. *Juglans regia*. 3. Fitoterapia. 4. Antimicrobianos. I. Back Brito, Graziella Nuernberg, orient. II. Universidade Estadual Paulista (Unesp), Instituto de Ciência e Tecnologia, São José dos Campos. III. Universidade Estadual Paulista 'Júlio de Mesquita Filho' - Unesp. IV. Universidade Estadual Paulista (Unesp). V. Título.

BANCA EXAMINADORA

Profa. Dra. Graziella Nuernberg Back Brito (Orientadora)

Universidade Estadual Paulista (Unesp)

Instituto de Ciência e Tecnologia

Campus de São José dos Campos

Profa. Dra. Luciane Vieira Garcia

Fundação Universitária Vida Cristã (FUNVIC)

Faculdade de Pindamonhangaba

Campus de Dutra

Profa. Dra. Fernanda Malagutti Tomé

Universidade Paulista (UNIP)

Instituto de Ciências da Saúde

Campus de São José dos Campos

São José dos Campos, 19 de dezembro de 2016.

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho a meus pais Helen e Ivens, e a meus avós Neyde (*in memoriam*) e Antonio, que me apoiam em todos os momentos, sejam eles felizes ou tristes.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus por me mostrar os caminhos ao qual devo seguir.

Agradeço a meus pais Helen e Ivens por todo carinho, dedicação e suporte, obrigado por me ensinar que tudo o que se deseja só se conquista com muito esforço, dedicação e foco. Mãe obrigado por todos os conselhos, pelos abraços, obrigado por ser essa mulher tão batalhadora que sempre me incentivou a buscar meus sonhos, te amo!

Agradeço a meu irmão João Pedro por me aturar nos momentos de maior estresse.

Agradeço a meus avós Neyde (*in memorian*) e Antonio, por todo carinho, por toda preocupação, por todo incentivo, pelos conselhos. Vó Neyde a senhora vai sempre fazer muita falta em nossas vidas. Agradeço a meu avô Antonio que me ensinou os melhores valores que um homem honrado pode ter, agradeço por todo incentivo que recebi do senhor para realizar meu sonho.

Agradeço a meus tios Edna e Aparecido pelo apoio, pelo carinho, por sempre se importarem comigo.

Agradeço a minha amiga/irmã Maria Aparecida Marras (Nena) e ao Sr. Ademar Colabardini, agradeço pelo carinho e apoio. Neninha obrigado pela sua alegria, pelas conversas; sem sua amizade o desenvolvimento deste trabalho seria difícil.

Agradeço a minha amiga/irmã 2, Marcia Martin. Obrigado por sua amizade, pelo seu carinho, por seus exemplos de positividade, força, alegria e autoconfiança. “Marcia your strength is the most beautiful thing that you share with me!”

Agradeço a professora Fernanda Malagutti Tomé por despertar em mim o interesse a pesquisa, por mostrar que a pesquisa científica era algo real e possível, obrigado por toda sua dedicação e carinho. Agradeço por despertar o fascínio por imunologia, agradeço por todos os ensinamentos, devo boa parte do meu conhecimento a sua dedicação.

Agradeço a minha professora orientadora Graziella Nuernberg Back Brito, obrigado por toda dedicação, disponibilidade, pelos conselhos e agradeço principalmente pelos exemplos de humildade e sabedoria. Professora Grazi me espelho em seu carinho por ensinar, agradeço por me tornar ainda mais apaixonado por imunologia e espero um dia ter tamanho conhecimento e humildade em minha carreira acadêmica.

Agradeço a professora Luciane Dias de Oliveira pelo apoio e dedicação para o desenvolvimento deste trabalho. Sua energia, positividade e paciência em ensinar são um grande exemplo a minha carreira acadêmica.

Agradeço as professoras. Samira E. A. Camargo, Renata F. Prado, Juliana C. Junqueira e Luana M. Vasconcellos pelos ensinamentos, dedicação e paciência em ensinar.

Agradeço a meus amigos Ana Luiza R. Palma, Cristiane P. Correia, Gabriela Santana e Nádia Domingues pelo carinho e amizade. Agradeço pelo apoio nos momentos alegres e difíceis.

Agradeço a Cristiane P. Correia, Jonatas R. Oliveira, Adeline L. Jorjão, Fernanda Freire e Marisol Velloso pela ajuda no desenvolvimento desse trabalho, com as técnicas ensinadas, a paciência em ensinar e a companhia no cotidiano do laboratório.

Agradeço aos colegas do Laboratório Leileane Cohn, Livia Mara, Mirian Mello e Rafaela Braga, agradeço pelos momentos alegres durante os experimentos.

Agradeço a Sérgio G. Alves pelo apoio ao desenvolvimento deste trabalho e ao apoio a minha empreitada culinária.

Agradeço aos funcionários da Universidade Estadual Paulista - UNESP, cada qual em sua singularidade, me ajudando no desenvolvimento desta pesquisa:

A Ana Paula S. C. Matos, Domingos G. Pontes e Vanessa R. dos Santos agradeço pela ajuda e disponibilidade.

Aos funcionários da secretaria de pós-graduação, Bruno Shiguemitsu M. Tanaka, Ivan Oliveira e Sandra Mara Cordeiro, agradeço a atenção e disponibilidade.

A Renata AP. Couto Martins pela atenção, paciência e dedicação para a normalização deste trabalho.

Agradeço imensamente a Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela bolsa de estudo concedida a mim, que me proporcionou dedicação exclusiva ao desenvolvimento deste trabalho.

E por fim agradeço a Universidade Estadual Paulista (UNESP) na pessoa do diretor do Instituto de Ciência e Tecnologia de São José dos Campos, Prof. Tit. Estevão Tomomitsu Kimpara, e da vice-diretora Profa. Adj. Rebeca Di Nicoló.

Ao Programa de Pós-graduação em Biopatologia Bucal. Na pessoa da coordenadora Prof. Dra. Ana Lia Anbinder. e vice-coordenadora Profa. Adj. Juliana Campos Junqueira.

*“You can be reborn over and over again until you find the most
fantastic part of yourself that makes you the most happy”*

Germanotta S. J. A. (Lady gaga)

SUMÁRIO

RESUMO	10
ABSTRACT	12
1 INTRODUÇÃO	13
2 PROPOSIÇÃO	19
2.1 Objetivo geral	19
2.1.1 Objetivos específicos	19
3 MATERIAL E MÉTODOS	20
3.1 Avaliação da atividade antimicrobiana dos extratos	20
3.1.1 Determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM) e Concentração Microbicida Mínima (CMM)	21
3.1.2 Avaliação da atividade antimicrobiana dos extratos em biofilmes monotípicos	24
3.1.2.1 Formação do Biofilme	24
3.1.2.2 Tratamento	25
3.1.2.3 Avaliação da Biomassa pelo teste do Cristal Violeta	27
3.1.2.4 Atividade metabólica dos micro-organismos pelo teste de MTT	27
3.2 Avaliação da citotoxicidade dos princípios ativos	28
3.2.1 Cultivo celular	29
3.2.2 Tratamento em células	30
3.2.3 Ensaio de citotoxicidade com MTT	31
3.2.4 Ensaio de citotoxicidade com cristal violeta	32
3.2.5 Ensaio de citotoxicidade com Vermelho neutro	32
3.3 Análise estatística	33
4 RESULTADO	34

4.1 Atividade antimicrobiana.....	34
4.1.1 Determinação da CIM e CMM dos micro-organismos em crescimento planctônico.....	34
4.1.2 Avaliação da redução de biomassa dos biofilmes monotípicos após exposição aos extratos.....	37
4.1.3 Avaliação da atividade metabólica dos micro-organismos em biofilme após exposição aos extratos.....	46
4.2 Citotoxicidade dos princípios ativos	55
4.2.1 Avaliação da Citotoxicidade pelo teste de MTT.....	55
4.2.2 Avaliação da Citotoxicidade pelo teste do Cristal Violeta.....	56
4.2.3 Avaliação da Citotoxicidade pelo teste do Vermelho Neutro.....	57
5 DISCUSSÃO.....	59
6 CONCLUSÃO.....	71
REFERÊNCIAS.....	73
ANEXOS.....	120

de Paula Ramos L. Atividade antimicrobiana e citotoxicidade dos extratos glicólicos de *Pfaffia paniculata* K. E *Juglans regia* L. [dissertação]. São José dos Campos (SP): Universidade Estadual Paulista (Unesp), Instituto de Ciência e Tecnologia; 2016.

RESUMO

O objetivo do trabalho foi investigar se os extratos de *Pfaffia paniculata* K. e *Juglans regia* L. possuem ação antifúngica, antibacteriana e toxicidade celular, com testes *in vitro*. Para os testes antifúngicos foram utilizadas cepas ATCC de *Candida* spp., e para os testes antibacterianos foram utilizadas cepas ATCC de *Enterococcus faecalis*, *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Streptococcus mutans* e *Pseudomonas aeruginosa*. Para a atividade antimicrobiana primeiramente foram determinados os valores da Concentração Inibitória Mínima (CIM) e da Concentração Microbicida Mínima (CMM) dos extratos pelo método de microdiluição em caldo, segundo *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI). Os micro-organismos que apresentaram CMM foram selecionados para os testes em biofilme, no qual foi preparado em fundo de placa com 96 poços, por 48 h. Após os biofilmes foram tratados por 5 min. utilizando as concentrações de 200, 100 e 50 mg dos extratos. Para mensuração da biomassa foi utilizado o teste de Cristal violeta (CV), e para avaliar a atividade metabólica foi utilizado o teste de MTT. A citotoxicidade foi avaliada sobre fibroblastos gengivais humanos (FMM-1) utilizando os mesmos parâmetros de tratamento utilizados para os testes em biofilmes. Foram avaliadas a viabilidade celular pelos testes de MTT, vermelho neutro e cristal violeta. Os dados obtiveram distribuição normal e foram analisados por ANOVA e teste de Tukey, com significância de 5% ($p < 0.05$). O extrato de *P. paniculata* demonstrou ação antifúngica em biofilmes, com reduções médias de 29,4 e 42,7% nos testes de CV e MTT. Já a ação antibacteriana foi restrita a *S. mutans* e *P. aeruginosa* com reduções médias de 15,7 e 28,6% nos respectivos testes. O extrato de *J. regia* também demonstrou ação antifúngica com redução média de 22,2% na biomassa e 31,4% na atividade metabólica. A ação antimicrobiana ficou restrita a *P. aeruginosa* com reduções médias de 17,7 e 15,6%, indicados pelos testes de CV e MTT. Quanto a citotoxicidade, a média entre os três testes realizados, indicou que após exposição ao extrato de *P. paniculata* 58,8% das células continuaram viáveis e para *J. regia* a viabilidade foi de 65,1%. Conclui-se que o extrato de *P. paniculata* demonstrou ação antifúngica sobre todas as cepas de *Candida* spp. testadas e demonstrou ação antibacteriana para *P. aeruginosa* e *S. mutans*. As concentrações de 200, 100 e 50 mg do extrato demonstraram ser citotóxicas conforme nova diretriz de

toxicidade. *J. regia* demonstrou ação antifúngica sobre todas as cepas de *Candida* spp. testadas e demonstrou ação antibacteriana sobre *P. aeruginosa*. Apenas a concentração de 200 mg do extrato se mostrou tóxica a FMM-1.

Palavras-chave: *Pfaffia paniculata*. *Juglans regia*. Fitoterapia. Antimicrobianos.

de Paula Ramos L. Activity antimicrobial and citotoxicity of glycol extracts of *Pfaffia paniculata* K AND *Juglans regia* L [dissertation]. São José dos Campos (SP): São Paulo State University (Unesp), Institute of Science and Technology; 2016.

ABSTRACT

The aim of this study was to investigate whether extracts of *Pfaffia paniculata* K. and *Juglans regia* L. have antifungal, antibacterial and cellular toxicity, with in vitro tests. ATCC strains of *Candida spp.* Were used for antifungal tests, and ATCC strains of *Enterococcus faecalis*, *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Streptococcus mutans* and *Pseudomonas aeruginosa* were used for the antibacterial tests. For the antimicrobial activity, the values of the Minimum Inhibitory Concentration (MIC) and the Minimal Microbicidal Concentration (CMM) of the extracts were determined by the microdilution method in broth, according to Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). The microorganisms that presented CMM were selected for the biofilm tests, in which it was prepared on a 96-well plate bottom for 48 h. After the biofilms were treated for 5 min. Using the concentrations of 200, 100 and 50 mg of the extracts. To measure the biomass, the Violet Crystal test (CV) was used, and the MTT test was used to evaluate the metabolic activity. Cytotoxicity was assessed on human gingival fibroblasts (FMM-1) using the same treatment parameters used for biofilm tests. Cell viability was evaluated by the MTT, neutral red and violet crystal tests. The data obtained normal distribution and were analyzed by ANOVA and Tukey test, with significance of 5%. The extract of *P. paniculata* showed antifungal action in biofilms, with average reductions of 29.4 and 42.7% in CV and MTT tests; The antibacterial action was restricted to *S. mutans* and *P. aeruginosa* with mean reductions of 15.7 and 28.6% in the respective tests. The extract of *J. regia* also demonstrated antifungal action with an average reduction of 22.2% in biomass and 31.4% in metabolic activity. The antimicrobial action was restricted to *P. aeruginosa* with mean reductions of 17.7 and 15.6%, indicated by CV and MTT tests. As for cytotoxicity, the mean of the three tests carried out indicated that after exposure to *P. paniculata* extract 58.8% of the cells remained viable and for viability the viability was 65.1%. In conclusion the extract of *P. paniculata* showed antifungal action on all strains of *Candida spp.* Tested and demonstrated antibacterial action for *P. aeruginosa* and *S. mutans*. The concentrations of 200, 100 and 50 mg of the extract proved to be cytotoxic according to the new toxicity guideline. *J. regia* demonstrated antifungal action on all strains of *Candida spp.* Tested and demonstrated antibacterial action on *P. aeruginosa*. Only the 200 mg concentration of the extract was shown to be toxic to FMM-1.

Keywords: *Pfaffia paniculata*. *Juglans regia*. Phytotherapy. Anti-Infective Agents.

1 INTRODUÇÃO

A resistência dos micro-organismos a fármacos tem tomado proporções alarmantes e seu aumento se tornou exponencial, seja na área médica, odontológica ou até mesmo alimentícia, sendo que o combate a bactérias e fungos se tornou um desafio. O uso indiscriminado e, muitas vezes, errôneo de antimicrobianos, a grande capacidade de adaptação dos micro-organismos e diversos outros fatores favorecerem a problemática estabelecida hoje (Kent et al., 2015).

Para que o processo infeccioso causado por agentes patogênicos se instaure no hospedeiro são necessários diversos fatores relacionados tanto ao hospedeiro, como por exemplo sua condição imunitária, como ao micro-organismo com a expressão de uma gama de fatores de virulência que assegurem resistência ao patógeno. Dentre esses fatores de resistência dos patógenos podemos destacar capacidade de invasão de células e tecidos, produção de adesinas, enzimas, presença de cápsula, entre outros (Porcheron, Dozois, 2015; Liu et al., 2015). Considerando o local, o quadro clínico do paciente e a doença que o acomete alguns micro-organismos despontam como principais causadores de infecções multirresistentes.

No Brasil, Pereira et al. (2013) verificou a prevalência de septicemias em pacientes pediátricos internados, em que as bactérias Gram negativas se mostraram causadoras de 49% dos casos, sendo *Klebsiella* spp., *Acinetobacter* spp. e *Pseudomonas aeruginosa* as prevalentes deste grupo. Já as Gram positivas corresponderam a 42,6% das infecções representadas principalmente, por *Staphylococcus aureus* e os 8,4% restantes foram representados por infecções causadas por fungos (Pereira et al., 2013; Baker, Satlin, 2016).

Dentre o grupo das bactérias Gram negativas *P. aeruginosa* se destaca como o segundo maior causador de infecções urinárias nos Estados Unidos da

América. Pacientes com cateter, portadores de fibrose cística ou com queimaduras, são fortemente acometidos por infecções desse micro-organismo. Isso se deve a sua grande resistência ao ambiente, comumente associado à formação de biofilme, fazendo com que o patógeno resista a grandes doses de desinfetantes (Falkinham 2015; Viganor et al., 2016).

As bactérias Gram positivas também apresentam representantes com altos índices de resistência a fármacos antimicrobianos. *Staphylococcus aureus* tem sido a espécie descrita como principal patógeno de infecções hospitalares. Por muitos anos a terapia contra *S. aureus* era baseada no emprego de meticilina, porém este patógeno desenvolveu mecanismos de resistência a este fármaco. Com a redução da eficácia deste medicamento, a troca de terapia foi necessária e o uso de vancomicina associada à linezolida começou a ser empregado. Contudo, com o passar do tempo, algumas cepas deste micro-organismo também desenvolveram fatores de resistência a esse glicopeptídeo. Hoje nas infecções nosocomiais são demonstrados variados níveis de resistência a meticilina e vancomicina tornando o seu controle uma difícil tarefa (Hu et al., 2013; Li et al., 2015).

Enterococcus faecalis apesar de não ser considerado um micro-organismo tão patogênico quanto *S. aureus*, está emergindo como o causador de infecções nosocomiais, como septicemia e infecções no trato urinário, seguido pelo agravante de resistência a medicamentos de primeira linhagem como ampicilina e gentamicina. Este micro-organismo se destaca não só pelo aumento de infecções de âmbito sistêmico, mas também por infecções bucais em que apresenta alta resistência a instrumentação mecânica e aos irrigantes utilizados para o tratamento de infecções radiculares (Aamodt et al., 2015; Mikalsen et al., 2015; Abdelkareem et al., 2016; Jenks et al., 2016).

Ainda dentre as gram positivas, *Streptococcus mutans*, pertencente ao grupo viridans do gênero *Streptococcus*, é frequentemente relacionado a

endocardite subaguda. Essa relação é devida ao polissacarídeo dextrano, produzido pelo grupo, que é mediador da adesão e virulência do micro-organismo às células cardíacas (Süzük et al., 2016; Nilson et al., 2016).

Além das bactérias, os fungos também tem apresentado um aumento nas taxas de infecções invasivas, com grande resistência aos fármacos disponíveis atualmente. Eles são considerados oportunistas, pois se aproveitam das condições imunitárias do hospedeiro para desenvolver uma infecção. Acometem principalmente pacientes em tratamentos quimioterápicos, imunossuprimidos e em antibioticoterapia por longos períodos. As infecções fúngicas são relacionadas a 49% dos casos de mortalidade por infecções nosocomiais, principalmente nos casos de septicemia. A espécie *Candida albicans* desponta como a espécie prevalente do gênero, sendo isolada em pacientes que fazem uso de cateter e também encontradas em infecções de canais radiculares. Estudos apontam que um grande número de cepas de *Candida* spp. apresentam resistência aos antifúngicos azólicos. Hoje, o tratamento de primeira escolha para as candidemias são as equinocandinas; apesar de mostrarem efeitos satisfatórios no tratamento já apresentam casos de resistência especialmente com a espécie *Candida glabrata* (Espinel-Ingroff et al., 2014; Lima et al., 2015; Rodríguez-Leguizamón et al., 2015; Castanheira et al., 2016).

Devido ao aumento de resistência aos fármacos, que os micro-organismos estão adquirindo, são necessários novos mecanismos de combate a esses patógenos. Neste aspecto a fitoterapia tem despontado com resultados promissores. O uso de plantas e seus derivados utilizados para o tratamento de doenças é conhecido há muitos séculos; Na Medicina Tradicional Chinesa, o uso de plantas para o tratamento de doenças data de mais de 3000 anos. O livro *The Devine Farmer's Classic of Herbalism* (Yang, Cao, 1998) é o compilado mais conhecido, representante dessa cultura, trazendo informações e

metodologias do conhecimento sobre plantas medicinais. Esse conhecimento é derivado da cultura popular, baseado em crenças e experiências indígenas e hoje com o desenvolvimento de tecnologias e o avanço da ciência, a fitoterapia se tornou um ramo de estudo com um aumento exponencial de pesquisas que verificam efeitos biológicos de substâncias derivadas de plantas (Yang, Cao, 1998; Sargin et al., 2013; Farooqui et al., 2015; Benzie, Wachtel-Galor, 2011; Jafari et al., 2015).

Utilizada popularmente como tônico para tratamentos de reumatismo, distúrbios gástricos e até mesmo para o tratamento do diabetes, *Pfaffia paniculata* K. é conhecida como o Ginseng brasileiro (Freitas et al, 2004). Estudos feitos com o extrato da raiz demonstram que ela possui importantes efeitos biológicos, com propriedades antioxidantes, efeitos analgésico e anti-inflamatório (Leal et al., 2010). O gênero *Hebanthe* teve sua nomenclatura alterada em 2008, ano no qual Marchioretto propôs a denominação *Pfaffia* mart para o gênero, pertencente a família Amaranthaceae. Não há concordância sobre o número exato de espécies; alguns autores citam que o gênero abrange entre 30 a 40 espécies, outros afirmam que ele possui exatas 21 espécies. É uma planta nativa da Região Neotropical, que abrange o sul do México e se estende através dos trópicos passando pela bacia Amazônica, Minas Gerais, Santa Catarina, Paraná até a Baía Blanca na Argentina. No Brasil a última revisão de taxóns realizada em 2002 mostrou que o gênero *Pfaffia* apresenta 22 espécies (Marchioretto et al., 2008, 2010).

Alguns poucos estudos relatam a constituição de *P. paniculata* e apontam a presença de diversas moléculas diferentes com efeitos biológicos importantes (Shiobara et al., 1993; Freitas et al., 2004; Rates, Gosmann, 2002). Shiobara et al. (1993) foram os pioneiros a identificar o ácido pfamérico ou pfáfico (nortriterpenoide) em sua constituição, o qual apresenta efeitos inibitórios no crescimento de células tumorais. Outra molécula presente em sua

constituição é uma classe de esteróis denominada β -ecdisterona que são importantes na indústria farmacêutica para a produção de cosméticos, devido ao seu poder de regeneração celular. Glicosídeos flavonoides também foram descritos em pesquisas sobre os constituintes da raiz (Freitas et al., 2004; Felipe et al., 2014; Leal et al., 2010; Madeira et al., 2003; Li et al., 2010). Os glicosídeos também apresentam efeitos inibitórios em células tumorais e são denominados pfafosídeos A,B,C,D,E e F, que demonstraram ação inibitória em melanomas, carcinomas e células tumorais no pulmão (Rates, Gosmann, 2002; Leal et al., 2010). Na busca por caracterizar os constituintes de *P. paniculata*, Takemoto et al. (1983) e Nishimoto et al. (1984) encontraram também moléculas como sitosteról, estigmasterol, glicosídeos e alantoínas, esta última apresenta efeito protetor para a pele, promovendo a hidratação e ação anti-inflamatória (Li et al., 2010; Savić et al., 2015).

Juglans regia L. é o nome científico de uma espécie popularmente conhecida como Nogueira, pertencente à família Juglandaceae, nativa do sudeste da Europa. Apresenta grande valor econômico para diversos ramos da indústria, como a madeira, que devido a durabilidade e beleza, é produzida principalmente na Espanha e em Portugal. É uma árvore que produz frutos conhecidos popularmente como noz europeia e são ricos em óleos compostos por ácidos graxos insaturados. O licor da noz proveniente dos frutos verdes é rico em antioxidantes naturais como ácido ascórbico, tocoferóis e polifenóis (Almeida et al., 2008; Fernández-Agullóa et al., 2013; Joshan, Singhb, 2013). As folhas são muito utilizadas na cultura popular para tratamento de doenças da pele como úlceras, irritações cutâneas, também utilizadas como antidiarreico e anti-helmíntico, para insuficiência venosa e ação adstringente (Fernández-Agullóa et al., 2013; Rather et al., 2012). Em um estudo conduzido por Farooqui e colaboradores em 2015 o extrato de *J. regia* apresentou importante efeito microbida, suas propriedades foram testadas em diversos micro-

organismos, inclusive cepas resistentes a diferentes fármacos.

Na pesquisa sobre a constituição do óleo essencial de *J. regia*, Rather et al. (2012) identificaram que ao todo existem 38 diferentes constituintes, com predominância de hidrocarbonetos monoterpenos e sesquiterpenos, tais como β -pineno, β -cariofileno, limoneno. Estes constituintes apresentam importantes propriedades antioxidantes, anti-inflamatórias, antimicrobianas; por vezes apresentam efeitos analgésicos e estimulantes (Ruberto, Baratta, 2000, Vermaa et al., 2013). Os efeitos antimicrobianos foram testados contra diferentes micro-organismos Gram negativos e Gram positivos em comparação a antibióticos padrão: Oxícilina, Tetraciclina, ácido Nalidixico, Ofloxacina, Chromaphenicol, Gentamicina, Penicilina (Farooqui et al., 2015).

Zakavi et al. (2013) verificaram os efeitos que extrato de *J. regia* exerce sobre bactérias da microbiota oral. Os extratos foram testados contra o principal micro-organismo relacionado a cárie, *Streptococcus mutans*, entre outros patógenos que habitam a cavidade bucal como *S. sanguis*, *S. salivarius* e *Staphylococcus aureus*. O estudo concluiu que *J. regia* possui importantes efeitos microbicidas variando sua ação conforme o tipo de extrato (alcoólico ou aquoso), e conforme o gênero e espécie do micro-organismo.

Diante da problemática atual envolvendo a resistência dos micro-organismos e poucos estudos dos efeitos biológicos das duas espécies descritas o presente trabalho teve por objetivo investigar se os extratos de *Pfaffia paniculata* K. e *Juglans regia* L. apresentam atividade antimicrobiana e se os mesmos não apresentam citotoxicidade através de testes *in vitro*, para que possam classificar os efeitos fitoterápicos dos extratos estudados.

2 PROPOSIÇÃO

O objetivo geral do presente trabalho foi investigar se os extratos de *Pfaffia paniculata* K. e *Juglans regia* L. possuem efeitos biológicos como: atividade antimicrobiana e citotoxicidade .

Os objetivos específicos foram:

- a) Verificar se os extratos possuem atividade antifúngica em biofilmes monotípicos e suspensões planctônicas de *Candida albicans*, *Candida glabrata*, *Candida guilhermondii*, *Candida krusei*, *Candida tropicalis* e *Candida dubliniensis*;
- b) Verificar se os extratos possuem atividade antibacteriana em biofilmes monotípicos e suspensões planctônicas de *Enterococcus faecalis*, *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus mutans* e *Pseudomonas aeruginosa*;
- c) Verificar se os extratos apresentam citotoxicidade celular em fibroblastos gengivais humanos (FMM-1).

3 MATERIAL E MÉTODOS

Foram adquiridos os extratos glicólicos da raiz da planta *Pfaffia paniculata* K. (Ginseng brasileiro), e o extrato da folha de *Juglans regia* L. (Nogueira), ambos na concentração de 200 mg/mL (20%), da empresa *Mapric* (São Paulo, SP), com os devidos laudos e especificações (ANEXO A e B).

3.1 Avaliação da atividade antimicrobiana dos extratos

A avaliação da atividade antimicrobiana dos extratos foi realizada sobre cepas de referência (ATCC - *American Type Culture Collection*) de *Candida albicans* (ATCC 18804), *Candida glabrata* (ATCC 9030), *Candida guilhermondii* (ATCC 6260), *Candida krusei* (ATCC 6258), *Candida tropicalis* (ATCC 13803) e *Candida dubliniensis* (ATCC MYA 646), *Staphylococcus aureus* (ATCC 6538), *Staphylococcus epidermidis* (ATCC 12228) *Enterococcus faecalis* (ATCC 4083), *Streptococcus mutans* (ATCC 35688) e *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 15442). As cepas são provenientes do Laboratório de Microbiologia e Imunologia do Instituto de Ciências e Tecnologia (ICT/UNESP).

3.1.1 Determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM) e Concentração Microbicida Mínima (CMM)

Para a determinação da CIM foi utilizado o método de microdiluição em caldo, segundo *Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI)*, normas M7-A9 que descreve testes com bactérias aeróbias e a norma M27-A3, que dispõem sobre testes com fungos.

Primeiramente as cepas de micro-organismos, que estavam congeladas em freezer -80°C (NuAire, Plymouth, USA), foram semeadas em meio sólido, *Brain Heart Infusion (BHI - Himédia)* para bactérias ou Sabouraud-dextrose (Himedia) para as leveduras, após semeadura as cepas foram encubados em estufa bacteriológica (37°C , com 5% de CO_2 para *S. mutans*) por 24 h para que fossem reativadas.

Passado o período de incubação foram alçadas algumas colônias das cepas reativadas, essas foram então diluídas em solução fisiológica estéril (NaCl 0,9%) e a suspensão padronizada em espectrofotômetro na concentração de em 10^6 células/mL, de acordo com as recomendações da (CLSI).

Após o preparo da suspensão de micro-organismos, foi iniciado o preparo das diluições dos extratos. Para isso foram distribuídos, nos poços da microplaca, 100 μL de meio de cultura líquido, sendo caldo Mueller Hinton (Himedia, Mumbai, Índia) para as bactérias, e meio RPMI 1640 (com glutamina, sem bicarbonato e com indicador vermelho de fenol) (Himedia) tamponado com MOPS [ácido 3-(N-morfolino) propanosulfônico] (Sigma-Aldrich, St. Louis, EUA) pH $7,0 \pm 0,1$, para as leveduras. A distribuição do meio foi feita utilizando 10 poços para cada grupo experimental de micro-organismo. Passada esta etapa, 100 μL dos extratos, na concentração de 200 mg/mL, foram adicionados apenas

no primeiro poço de cada grupo, de onde partiram uma série de 10 diluições seriadas. As diluições testadas estão demonstradas na tabela 1.

Tabela 1- Diluições dos extratos de *Pfaffia paniculata* e *Juglans regia*, obtidas pelo teste de Microdiluição em caldo, aplicadas nos micro-organismos

Micro-organismo	Diluições dos extratos (mg/mL)									
<i>C. albicans</i>	100	50	25	12,5	6,25	3,12	1,56	0,78	0,39	0,19
<i>C. dubliniensis</i>	100	50	25	12,5	6,25	3,12	1,56	0,78	0,39	0,19
<i>C. glabrata</i>	100	50	25	12,5	6,25	3,12	1,56	0,78	0,39	0,19
<i>C. guilliermondii</i>	100	50	25	12,5	6,25	3,12	1,56	0,78	0,39	0,19
<i>C. krusei</i>	100	50	25	12,5	6,25	3,12	1,56	0,78	0,39	0,19
<i>C. tropicalis</i>	100	50	25	12,5	6,25	3,12	1,56	0,78	0,39	0,19
<i>E. faecalis</i>	100	50	25	12,5	6,25	3,12	1,56	0,78	0,39	0,19
<i>P. aeruginosa</i>	100	50	25	12,5	6,25	3,12	1,56	0,78	0,39	0,19
<i>S. aureus</i>	100	50	25	12,5	6,25	3,12	1,56	0,78	0,39	0,19
<i>S. epidermidis</i>	100	50	25	12,5	6,25	3,12	1,56	0,78	0,39	0,19
<i>S. mutans</i>	100	50	25	12,5	6,25	3,12	1,56	0,78	0,39	0,19

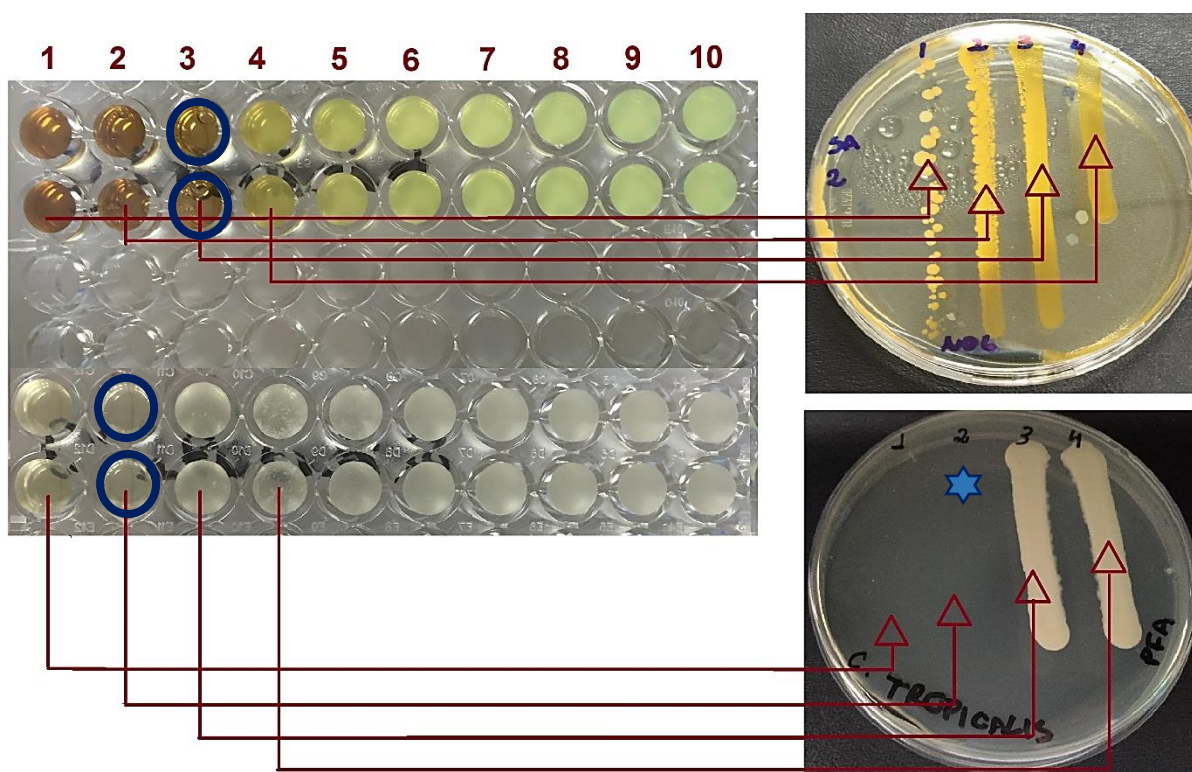
Fonte: Elaborado pelo próprio autor.

Após o preparo das diversas concentrações dos extratos foram adicionados 100 µL/poço dos inóculos padronizados, nos poços dos seus respectivos grupos. Após os procedimentos, as placas foram incubadas a 37°C, em estufa bacteriológica, por 24 h. Os testes foram realizados em duplicata.

A CIM, concentração capaz de inibir o desenvolvimento do micro-organismo, foi determinada no último poço da microplaca que não apresentou turvação após incubação.

Para determinar a CMM dos extratos, ou seja concentração capaz de promover a morte do micro-organismo, foi necessário inocular em ágar BHI (bactérias) ou Sabouraud-dextrose (leveduras) 10 μ L de alguns poços da microplaca. Os poços eleitos para a semeadura se basearam a partir da CIM, onde foram semeados o poço da CIM, assim como um anterior e outro posterior a ela. Após incubação de 48 h foi avaliado se as placas apresentaram crescimento de colônias, determinando a CMM de cada extrato, no rastro no qual não houve o desenvolvimento de colônias, como pode ser observado na figura 1.

Figura 1 - Procedimento para determinação da CIM e CMM dos extratos de *Pfaffia paniculata* e *Juglans regia*



Legenda: O círculo azul indica o último poço da microplaca que não apresentou turvação, onde foi determinada a CIM. As setas em vermelho indicam os poços da microplaca que foram semeados em meio sólido para determinação da CMM. A estrela em azul indica a CMM.

Fonte: Elaborado pelo próprio autor.

3.1.2 Avaliação da atividade antimicrobiana dos extratos em biofilmes monotípicos

A partir da triagem promovida pelo teste de microdiluição em caldo, os extratos (*P. paniculata* e *J. regia*) que apresentaram a CMM foram testados sobre biofilmes monotípicos *in vitro*.

3.1.2.1 Formação do Biofilme

Os biofilmes foram formados em fundo de placas de 96 poços. Para tanto foi preparado o inóculo de cada micro-organismo em caldo *Brain Heart Infusion* (BHI – Himédia) para bactérias ou Yeast Nitrogen Base (YNB – Himedia) suplementado com 100 mM de glicose, diluído 10 vezes em água destilada estéril para fungos, incubados em estufa a 37°C por 16 h. Após a incubação o inóculo foi lavado duas vezes com solução fisiológica estéril (NaCl 0,9%) e feitas suspensões padronizadas em espectrofotômetro (B582, Micronal, São Paulo, Brasil) contendo 10^7 células/mL.

Foram adicionados 100 µL da suspensão padronizada em cada poço da microplaca (N=10/grupo) e 100 µL de caldo BHI (bactérias) ou YNB (leveduras). A placa foi incubada em estufa a 37°C sob agitação de 75 rpm por 24 h. Após esse período, houve troca do meio de cultura com nova incubação de 24 h, totalizando um biofilme com 48 h de formação. Os grupos experimentais podem ser observados na tabela 2.

Tabela 2 - Grupos experimentais para os testes em biofilme

Micro-organismo	Grupo controle (-)	Grupo extrato			Grupo controle (+)
		200 mg	100 mg	50 mg	
<i>P. aeruginosa</i>	n=20	n=20	n=20	n=20	n=20
<i>S. mutans</i>	n=20	n=20	n=20	n=20	n=20
<i>C. albicans</i>	n=20	n=20	n=20	n=20	n=20
<i>C. dubliniensis</i>	n=20	n=20	n=20	n=20	n=20
<i>C. glabrata</i>	n=20	n=20	n=20	n=20	n=20
<i>C. guilliermondii</i>	n=20	n=20	n=20	n=20	n=20
<i>C. krusei</i>	n=20	n=20	n=20	n=20	n=20
<i>C. tropicalis</i>	n=20	n=20	n=20	n=20	n=20

Legenda: **Grupo controle (-)**: tratamento com NaCl 0,9%; **Grupo extrato**: Tratamento com extrato de *P. paniculata* ou *J. regia* nas concentrações de 200, 100 e 50 mg. **Grupo controle (+)**: tratamento com Clorexidina (bactérias) ou Nistatina (leveduras).

Fonte: Elaborado pelo próprio autor.

3.1.2.2 Tratamento

Após o período de formação de cada biofilme, o mesmo foi colocado em contato com seu respectivo extrato (*P. paniculata* ou *J. regia*) pelo período de 5 minutos. A partir dos valores de CMM encontrados no teste de MIC, foram determinados o uso de três altas concentrações para os testes com biofilmes, devido sua maior complexidade estrutural e dificuldade de difusão de substâncias. As concentrações testadas foram de 200, 100 e 50 mg/mL. Como controles foram utilizadas soluções antimicrobianas conhecidas, como clorexidina 0,2% (bactérias) e nistatina 100.000 Ui/mL (levedura). Solução

fisiológica estéril (NaCl 0,9%) foi utilizada como controle negativo, como pode ser observado na figura 2. Para todos os tratamentos foram adicionados 200 μ L/ poço. Posteriormente, estas soluções foram descartadas e o biofilme lavado com solução fisiológica estéril (NaCl 0,9%) por duas vezes.

Figura 2 - Tratamentos aplicados por 5 min nos grupos experimentais



Legenda: **A:** Grupo controle (-) NaCl 0,9%; **B:** Extrato de *P. paniculata* na concentração de 200 mg; **C:** Extrato de *P. paniculata* na concentração de 100 mg; **D:** Extrato de *P. paniculata* na concentração de 50 mg; **E:** Grupo controle (+) Nistatina ou clorexidina; **F:** Extrato de *J. regia* na concentração de 200 mg; **G:** Extrato de *J. regia* na concentração de 100 mg; **H:** Extrato de *J. regia* na concentração de 50 mg.

Fonte: Elaborado pelo próprio autor.

Para quantificação do biofilme foram utilizados dois testes que se complementam para um melhor resultado. O teste de cristal violeta fornece a biomassa do biofilme e o teste de MTT indica a atividade metabólica das células

dos micro-organismos. Foram realizados 2 experimentos independentes, com 10 repetições cada, totalizando n=20 para cada grupo experimental.

3.1.2.3 Avaliação da Biomassa pelo teste do Cristal Violeta

Após aplicação dos tratamentos foram adicionados 200 µL/ poço de metanol por 20 minutos para fixação do biofilme. Em seguida o metanol foi retirado e a placa foi incubada a 37°C por 24 h, para secagem. Após incubação foram adicionados 200 µL/ poço de cristal violeta a 1% (V/V) por 5 min. O corante foi retirado e lavagens com solução fisiológica estéril (NaCl 0,9%) e com ácido acético a 33% (V/V) foram realizadas. Em seguida a placa foi lida em leitora de microplaca e as densidades ópticas (DO) convertidas na biomassa do biofilme, através da fórmula abaixo:

% redução da biomassa = (DO Grupo Tratado x 100) / Média DO Grupo Controle)

3.1.2.4 Atividade metabólica dos micro-organismos pelo teste de MTT

Após submetido aos respectivos tratamentos o biofilme foi preparado para o teste de MTT (3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-Diphenyltetrazolium Bromide). Para isso foram adicionados 200 µL da solução de MTT a placa foi incubada ao abrigo da luz por 1 h em estufa a 37°C. Passado o período de incubação foi retirada a solução de MTT e adicionado 200 µL de

Dimetilsulfóxido (DMSO). A placa foi novamente incubada em estufa a 37°C por 10 min sob agitação constante por 10 min. Em seguida a placa foi lida em leitora de microplaca em 570 nm e as densidades ópticas obtidas foram convertidas, através da fórmula abaixo, em percentual de atividade metabólica das células do micro-organismo:

% Atividade metabólica = (DO Grupo Tratado x 100) / Média DO Grupo Controle)

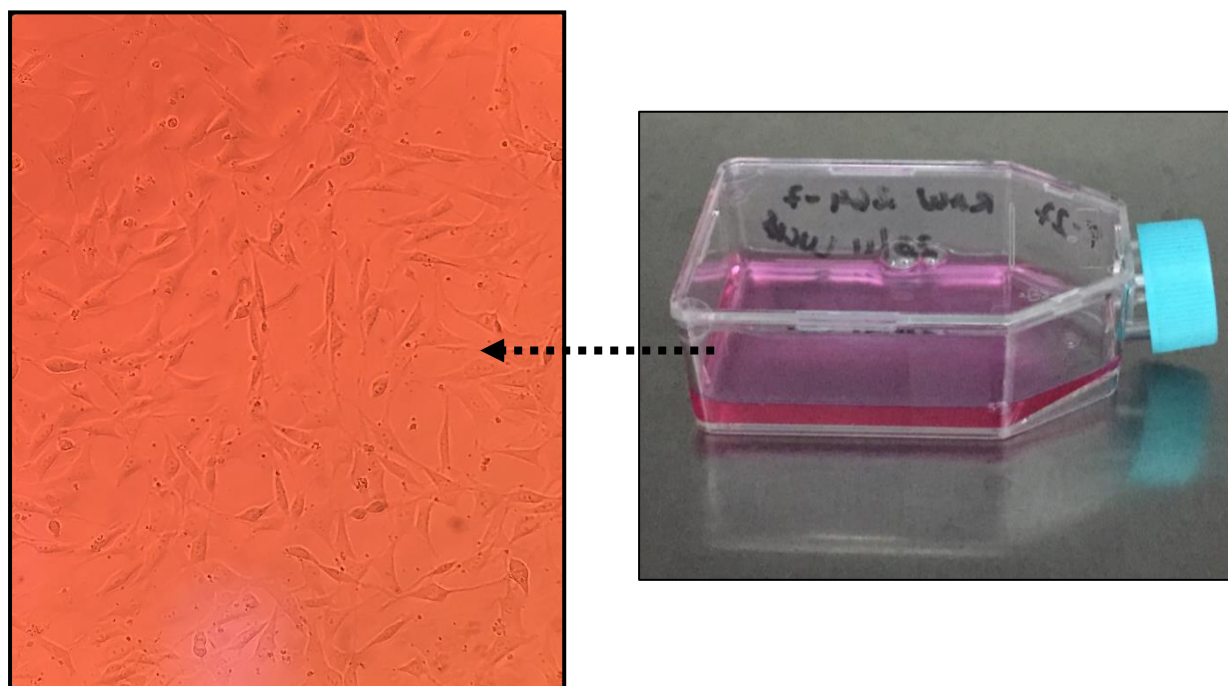
3.2 Avaliação da citotoxicidade dos princípios ativos

A citotoxicidade dos extratos naturais de *P. paniculata* e *J. regia* foi avaliada através de três diferentes testes colorimétricos, Teste de MTT, Teste do cristal violeta e Teste do Vermelho Neutro, com a avaliação de diferentes constituintes da célula. O Teste de MTT consiste na capacidade de células viáveis em clivar o sal tretazólico (MTT) em cristais de formazam, devida a presença de enzimas redutases e alguns outros cofatores presentes no citoplasma, mitocôndrias, lisossomos, fornecendo através da atividade metabólica a quantidade de células viáveis. O teste do vermelho neutro avalia a atividade lisossomal da célula, através da incorporação do corante a organela, fornecendo a viabilidade da mesma. E por fim, o teste do cristal violeta, onde o corante básico interage e se incorpora a estruturas celulares que possuem cargas negativas, como o DNA e a membrana plasmática, fornecendo assim quantificação da viabilidade celular, sendo a densidade da coloração proporcional a viabilidade celular.

3.2.1 Cultivo Celular

Para a realização dos testes foram cultivadas células da linhagem FMM 1 (Fibroblastos gengivais humanos), presentes na figura 3, provenientes do Banco de Células do Rio de Janeiro - Associação Técnico Científica Paul Ehrlich (APABCAM – RJ).

Figura 3 - Células da linhagem FMM-1 (Fibroblastos Gengivais Humanos) visualizados por microscopia óptica



Fonte: Elaborado pelo próprio autor.

Após descongelamento as células foram mantidas em frascos de cultivo celular (TPP, Suíça), cultivadas em meio de Eagle modificado por Dulbecco (DMEM - LGC Biotecnologia, Cotia, Brasil), suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB) (Invitrogen, Nova York, EUA), incubadas em estufa à

temperatura de 37°C, com umidade atmosférica, com 5% de CO₂. O meio de cultura foi trocado a cada 48 h e quando fosse observado estado de subconfluência das células, caracterizado pela ocupação de mais de 70% do frasco, as células eram transferidas para outro frasco celular.

Para utilização nos testes, a monocamada de células foi desagregada do assoalho do frasco de cultura com tripsina (LGC). Em seguida as células foram re-suspendidas em meio DMEM + 10% SFB e transferidas para um falcon onde foram centrifugadas por 5 min à 2000 rpm. A quantificação do número de células viáveis para o teste foi realizada através do teste de exclusão com azul de Trypan.

Após contagem, foram adicionados 200 µL de meio DMEM + 10% SFB, contendo 4×10^4 células viáveis, em microplacas de 96 poços. Estas placas foram incubadas (37°C, com 5% de CO₂) por 24 h para que ocorra aderência celular nos poços da microplaca.

3.2.2 Tratamento em células

Após o período de aderência celular o sobrenadante foi removido para aplicação dos extratos de *P. paniculta* e *J. regia* separadamente e foram testadas as concentrações de 50 mg/mL, 100 mg/mL e 200 mg/mL com base nos resultados obtidos pela aplicação do extrato em biofilmes microbianos. Para obter essas concentrações os extratos foram diluídos em meio de cultura DMEM + 10% SFB. Foram aplicados 200 µL das respectivas concentrações conforme grupo experimental, por 5 min. O grupo controle recebeu apenas o tratamento com DMEM + 10 % SFB pelo mesmo período. Cada grupo experimental foi realizado com N= 10 com duas repetições independentes.

Após os tratamentos realizados, os extratos ou DMEM + 10% SFB foram retirados da placa e após foram realizadas duas lavagens com solução salina (NaCl 0,9%) para remoção de células mortas desagregadas do fundo da placa. As placas foram então destinadas aos testes de viabilidade celular.

3.2.3 Ensaio de citotoxicidade com MTT

Para a análise da atividade metabólica das células viáveis, a solução de MTT foi preparada, ao abrigo da luz, a partir da suspensão de 0,5 mg do pó de MTT (Sigma Aldrich Co., Alemanha) em 1 mL de solução tampão de fosfato (PBS) (Cultilab, Brasil) estéril, obtendo a concentração de 0,5 mg/mL.

Após a aplicação do tratamento foram adicionados 100 µL/poço da solução de MTT. As placas foram incubadas (37°C, com 5% de CO₂) pelo período de 1 h, abrigadas da luz. Posteriormente a solução foi descartada e foram adicionados 100 µL/poço de dimetilsulfóxido (DMSO – Sigma) para expor os cristais de formazam metabolizados por células viáveis. Após incubação de 10 min e agitação em *shaker*, por igual período, a absorbância dos poços foi lida em leitora de microplacas com comprimento de onda de 570 nm. As densidades ópticas (DO) obtidas foram convertidas em percentual de viabilidade celular através da seguinte fórmula:

$$\% \text{ Viabilidade} = (\text{DO Grupo Tratado} \times 100) / \text{Média DO Grupo Controle}$$

3.2.4 Ensaio de citotoxicidade com Cristal Violeta

Para o preparo da solução de Cristal Violeta foram solubilizados 0,2 mg do corante para cada mL da suspensão.

Após a aplicação do tratamento com os extratos, foram adicionados 100 μL / poço de formaldeído 10% (Synth, SP, Brasil), as células foram fixadas por 10 minutos, após este período foi adicionado a solução de cristal violeta a 0,2% onde foram distribuídos 100 μL /poço com incubação de 15 min, ao abrigo da luz. Após período de incubação a solução de cristal violeta foi lavada com água destilada até que não se nota-se mais a presença do corante. Posteriormente as lavagens foi adicionado 100 μL /poço de álcool etílico, a placa foi levada ao *shaker* por 10 min e após foi realizada a leitura da microplaca em espectrofotômetro. O comprimento de onda utilizado para a leitura foi de 570 nm. As densidades ópticas obtidas foram convertidas em percentual de viabilidade celular.

3.2.5 Ensaio de citotoxicidade com Vermelho Neutro

Para avaliar a incorporação do vermelho neutro aos lisossomos primeiramente foi preparada a solução do vermelho neutro, para isso 20 $\mu\text{g}/\text{mL}$ do corante vermelho neutro (Vetec/ Sigma Aldrich, SP, Brasil) foi solubilizado em solução tampão de fosfato (PBS), ao abrigo da luz.

Após os devidos tratamentos com os extratos, a solução de Vermelho neutro foi adicionada a placa de 96 poços no volume de 100 μL / poço, a placa foi incubada ao abrigo da luz por 2 h a 37°C com 5% de CO_2 . Após o período de

incubação a solução de vermelho neutro foi retirada da placa e foram acrescentados 100 μ L/ poço de álcool etílico. A placa foi levada ao *shaker* por 15 min e após foi realizada sua leitura em leitor de placa em 570 nm. Os Valores obtidos foram convertidos em percentual de viabilidade celular.

3.3 Análise estatística

Os dados obtidos pelos testes de atividade antimicrobiana e citotoxicidade passaram pelo teste de normalidade e foram analisados estatisticamente pelo método ANOVA complementado pelo Teste de Tukey, com nível de significância de 5% ($p \leq 0.05$).

4 RESULTADOS

4.1 Atividade antimicrobiana

4.1.1 Determinação da CIM e CMM dos micro-organismos em crescimento planctônico

No teste de microdiluição em caldo *P. paniculata* apresentou CIM para todos os micro-organismos testados. Como pode ser observado na Tabela 3, *C. albicans*, *C. dubliniensis*, *C. glabrata*, *C. tropicalis* e *C. guilhermondii* apresentaram inibição de crescimento com 50mg/mL do extrato; já *C. krusei* apresentou inibição com 100 mg/mL. Em relação às bactérias, quando expostas ao extrato, *S. aureus* sofreu inibição de crescimento com 100 mg/mL, enquanto *P. aeruginosa* e *S. mutans* com 50 mg/mL e *E. faecalis* e *S. epidermidis* foram inibidos com 25 mg/mL.

Para três bactérias não foram encontradas Concentração Microbicida Mínima (CMM) com o extrato de *P. paniculata*, sendo elas *S. aureus*, *E. faecalis* e *S. epidermidis*. Já para *S. mutans* foi constatada ausência de crescimento em meio sólido, com 100 mg/mL do extrato e *P. aeruginosa* com 50 mg/mL.

P. paniculata demonstrou potencial antifúngico com concentração microbicida em 100 mg/mL para *C. albicans*, *C. krusei*, *C. dubliniensis* e *C. glabrata*. Já *C. tropicalis* e *C. guilhermondii* obtiveram CMM em 50 mg/mL.

Tabela 3 - Concentração inibitória mínima (CIM) e Concentração microbicida mínima (CMM) do extrato de *Pfaffia paniculata* para as espécies de micro-organismos

Extrato Glicólico de <i>Pfaffia paniculata</i>			
Micro-organismo	CIM (mg/mL)	Micro-organismo	CMM (mg/mL)
<i>E. faecalis</i>	25 mg/mL	<i>P. aeruginosa</i>	50 mg/mL
<i>S. epidermidis</i>	25 mg/mL	<i>C. tropicalis</i>	50 mg/mL
<i>P. aeruginosa</i>	50 mg/mL	<i>S. mutans</i>	100 mg/mL
<i>S. mutans</i>	50 mg/mL	<i>C. albicans</i>	100 mg/mL
<i>C. albicans</i>	50 mg/mL	<i>C. dubliniensis</i>	100 mg/mL
<i>C. dubliniensis</i>	50 mg/mL	<i>C. glabrata</i>	100 mg/mL
<i>C. glabrata</i>	50 mg/mL	<i>C. guilliermondii</i>	100 mg/mL
<i>C. guilliermondii</i>	50 mg/mL	<i>C. krusei</i>	100 mg/mL
<i>C. tropicalis</i>	50 mg/mL	<i>E. faecalis</i>	ausente
<i>S. aureus</i>	100 mg/mL	<i>S. aureus</i>	ausente
<i>C. krusei</i>	100 mg/mL	<i>S. epidermidis</i>	ausente

Fonte: Elaborado pelo próprio autor.

O extrato de *J. regia* apresentou concentração inibitória mínima (CIM) para todos os fungos e bactérias testados. Quanto às bactérias *P. aeruginosa* e *E. faecalis* foram inibidos com 25 mg/mL, *S. aureus* e *S. mutans* com 50 mg/mL e *S. epidermidis* com 100 mg/mL. Os resultados podem observados na Tabela 4.

O extrato de *J. regia* apresentou concentração microbicida mínima (CMM) frente a *P. aeruginosa*, com 50 mg/mL. Quando aplicado em fungos o extrato demonstrou potencial antifúngico em *C. krusei*, *C. glabrata*, *C. tropicalis* e *C. guilhermondii* que obtiveram CMM com 25 mg/mL e *C. albicans* e *C. dubliniensis* apresentaram CMM com 50 mg/mL.

Tabela 4 - Concentração inibitória mínima (CIM) e Concentração microbicida mínima (CMM) do extrato de *Juglans regia* L aplicado em micro-organismos

Extrato Glicólico de <i>Juglans regia</i>			
Micro-organismo	CIM (mg/mL)	Micro-organismo	CMM (mg/mL)
<i>C. dubliniensis</i>	12,5 mg/mL	<i>C. glabrata</i>	25 mg/mL
<i>C. guilliermondii</i>	12,5 mg/mL	<i>C. guilliermondii</i>	25 mg/mL
<i>C. tropicalis</i>	12,5 mg/mL	<i>C. krusei</i>	25 mg/mL
<i>E. faecalis</i>	25 mg/mL	<i>C. tropicalis</i>	25 mg/mL
<i>P. aeruginosa</i>	25 mg/mL	<i>P. aeruginosa</i>	50 mg/mL
<i>C. albicans</i>	25 mg/mL	<i>C. albicans</i>	50 mg/mL
<i>C. glabrata</i>	25 mg/mL	<i>C. dubliniensis</i>	50 mg/mL
<i>C. krusei</i>	25 mg/mL	<i>E. faecalis</i>	ausente
<i>S. aureus</i>	50 mg/mL	<i>S. aureus</i>	ausente
<i>S. mutans</i>	50 mg/mL	<i>S. epidermidis</i>	ausente
<i>S. epidermidis</i>	100 mg/mL	<i>S. mutans</i>	ausente

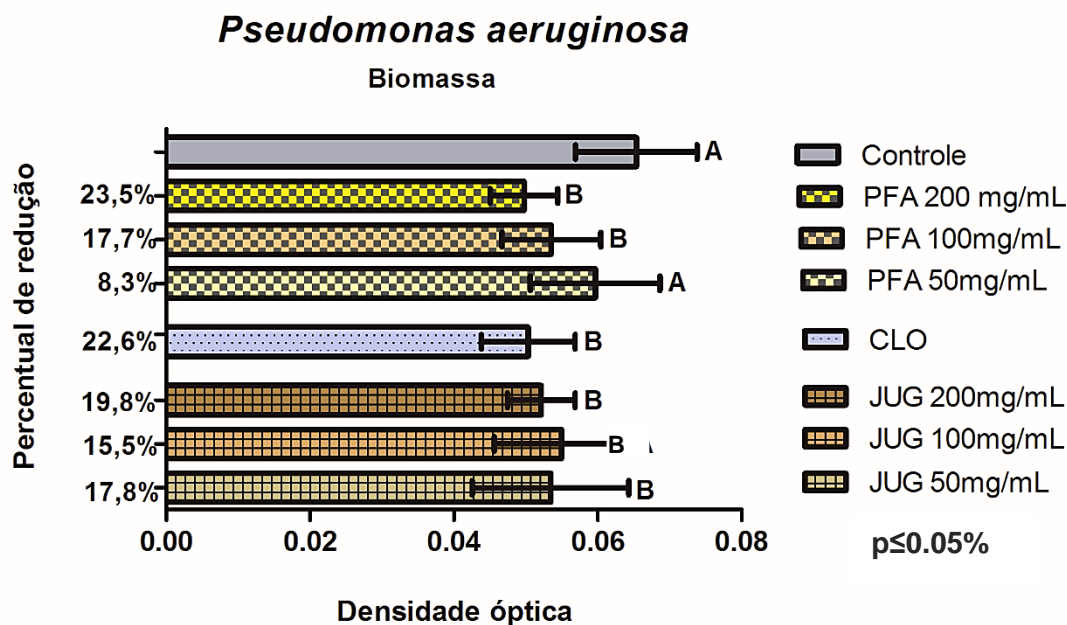
Fonte: Elaborado pelo próprio autor.

A partir da triagem promovida pelo teste de microdiluição em caldo foram iniciados os testes em biofilmes, somente das espécies que apresentaram CMM quando expostas ao tratamento. As concentrações que mais obtiveram ação microbicida nos testes em cultura planctônica foram 100 mg, 50 mg/mL e 25 mg/mL, porém como já é descrito na literatura, devido a maior resistência do biofilme a ação de fármacos, as concentrações dos extratos testadas em biofilme foram de 200 mg/mL, 100 mg/mL e 50 mg/mL.

4.1.2 Avaliação da redução de biomassa dos biofilmes monotípicos após exposição aos extratos

Após o tratamento por 5 min o extrato de *P. paniculata* causou a redução de 23,5% da biomassa do biofilme de *P. aeruginosa* na concentração de 200 mg/mL e 100 mg/mL reduziu 17,7%. Já a concentração de 50 mg/mL causou 8,3% de redução, redução sem significância estatística ($p < 0.05$) comparadas ao grupo controle de crescimento. O extrato de *Juglans regia* reduziu com significância estatística ($p < 0.05$) as três concentrações teste, sendo elas 200 mg, 100 mg e 50 mg. A redução percentual promovida pelo extrato a 200 mg/mL foi de 19,8%; 100 mg/mL reduziu em 15,5% e a concentração de 50 mg/mL promoveu a redução de 17,8% a biomassa de *P. aeruginosa*. O grupo controle de tratamento, com digluconato de clorexidina a 0,12%, promoveu a redução de 22,6% da biomassa de *P. aeruginosa*, quando comparada aos grupos teste dos extratos a redução foi semelhante estatisticamente na redução do biomassa, como pode ser observado na Figura 4.

Figura 4 - Avaliação da biomassa de biofilme de *Pseudomonas aeruginosa* tratado com os extratos glicólicos de *Pfaffia paniculata* e *Juglans regia* por 5 min, nas diferentes concentrações

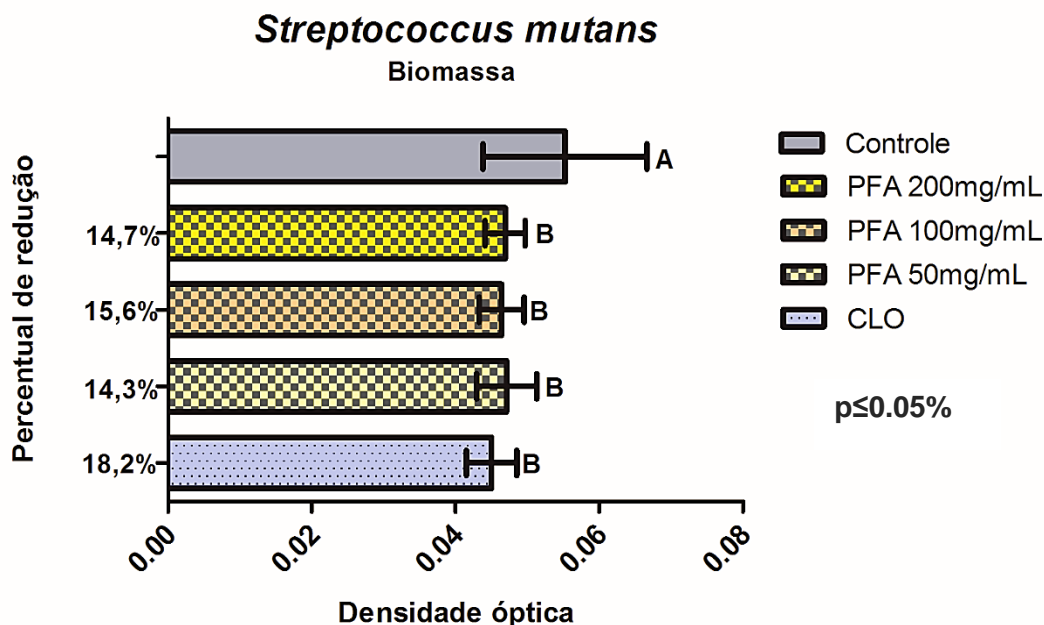


Legenda: PFA – Extrato glicólico de *Pfaffia paniculata*; JUG – Extrato glicólico de *Juglans regia*; CLO – Diglucunato de Clorexidina 0,12%. Dados com distribuição normal analisados pelo teste ANOVA suplementado pelo teste de Tukey ($p \leq 0.05\%$)

Fonte: Elaborado pelo autor.

Para *S. mutans* foi aplicado apenas o extrato de *P. paniculata* pois só este apresentou CMM no teste de microdiluição em caldo. As concentrações de 200 mg, 100 mg e 50 mg do extrato de *P. paniculata* promoveram a redução de 14,7%, 15,6% e 14,3% respectivamente, similar a clorexidina com 18,2%, estes grupos obtiveram redução com significância estatística ($p < 0.05$) quando comparadas ao grupo controle de crescimento. Os valores podem ser observados na Figura 5.

Figura 5 - Avaliação da biomassa de biofilme de *Streptococcus mutans* tratado com o extrato glicólico de *Pfaffia paniculata* por 5 min, nas diferentes concentrações



Legenda: PFA – Extrato glicólico de *Pfaffia paniculata*; CLO – Diglucunato de Clorexidina 0,12%
Dados com distribuição normal analisados pelo teste ANOVA suplementado pelo teste de Tukey ($p \leq 0.05\%$)

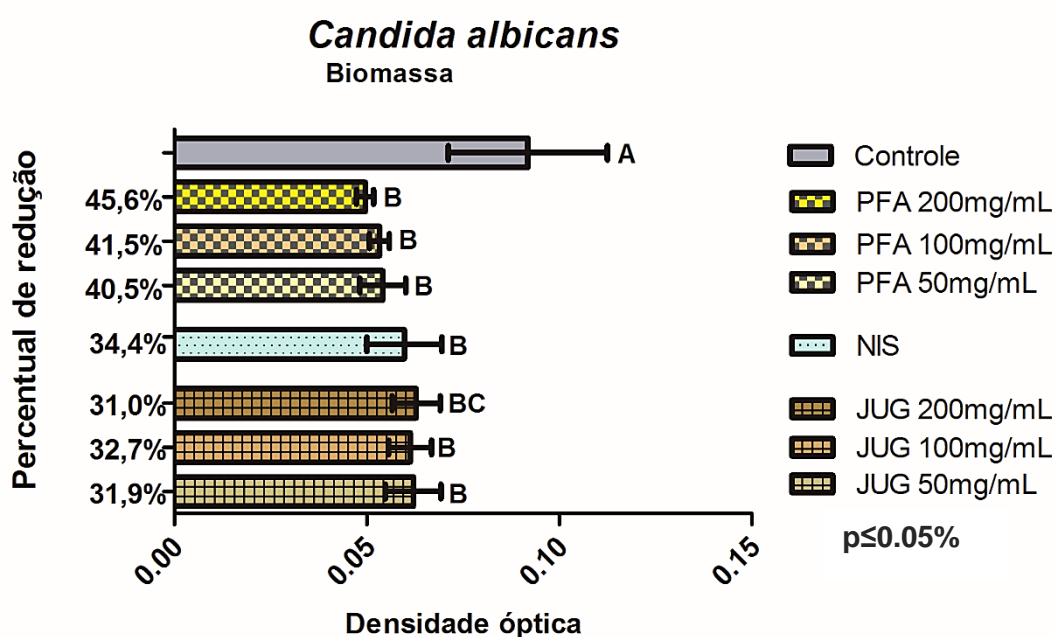
Fonte: Elaborado pelo autor.

O extrato glicólico de *P. paniculata* demonstrou ação antifúngica, houve redução com significância estatística ($p < 0,05\%$) em todas as concentrações testadas aplicadas em biofilme de *C. albicans* e com resultados similares estatisticamente à redução promovida pela nistatina. A biomassa de *C. albicans* foi reduzida em 45,6% quando exposta a 200 mg/mL do extrato por 5 min, 100 mg/mL reduziu 41,5% e 50 mg/mL reduziu 40,5% da biomassa.

O extrato de *J. regia* na concentração de 200 mg/mL reduziu a biomassa em 31,0%, 100 mg/mL foi capaz de reduzir 32,7% e 50 mg/mL, 31,9%. Os resultados obtidos foram similares ao da nistatina que apresentou redução de 34,4%. Todos os grupos tratados com *J. regia* apresentaram redução com

significância estatística ($p < 0.05$) comparados ao grupo controle. Os valores podem ser observados na Figura 6.

Figura 6 - Avaliação da biomassa de biofilme de *Candida albicans* tratado com os extratos glicólicos de *Pfaffia paniculata* e *Juglans regia* por 5 min, nas diferentes concentrações



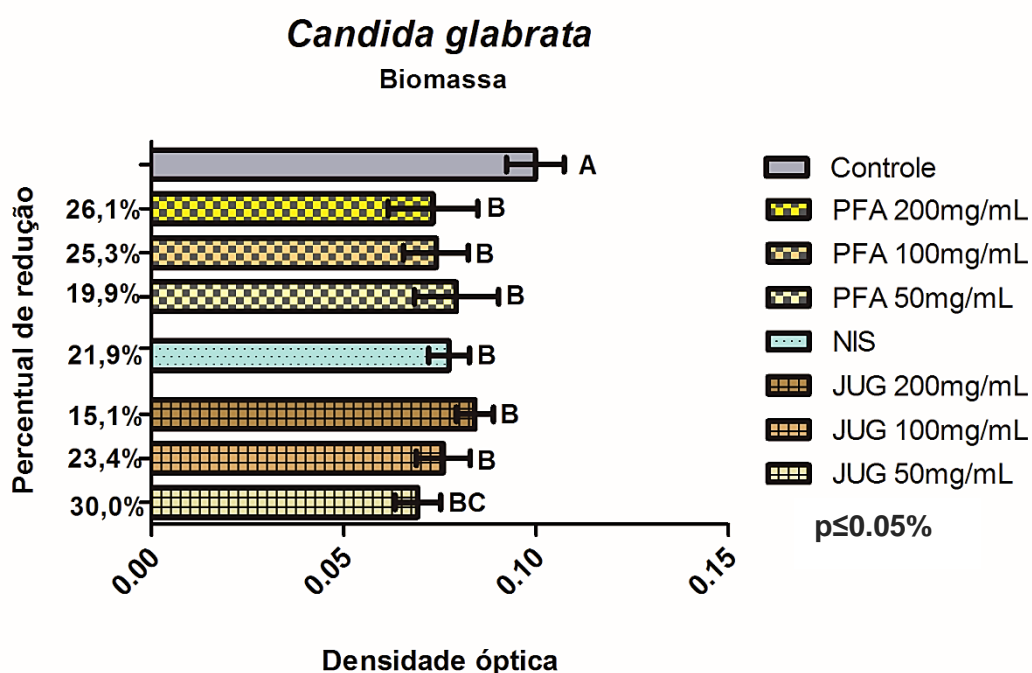
Legenda: PFA – Extrato glicólico de *Pfaffia paniculata*; JUG – Extrato glicólico de *Juglans regia*; NIS – Nistatina. Dados com distribuição normal analisados pelo teste ANOVA suplementado pelo teste de Tukey ($p \leq 0.05\%$)

Fonte: Elaborado pelo autor.

C. glabrata teve sua biomassa reduzida em 26,1% com o extrato de *P. paniculata* na concentração de 200 mg/mL, como mostra a figura 7. Com 100 mg/mL a redução promovida foi de 25,3% e com 50 mg/mL a redução foi de 19,9%. Todas as reduções foram significativas estatisticamente ($p < 0,05\%$) e com similaridade entre as diferentes concentrações. O extrato de *J. regia* nas concentrações de 100 mg e 50 mg promoveram a redução percentual de 23,4% e 30,0% respectivamente, o grupo 200 mg reduziu em 15,1% a biomassa do

fungo. A nistatina obteve 21,9 % de redução da biomassa de *C. glabrata*. Quando comparada as concentrações testes dos extratos não apresentou diferença com significância estatística ($p < 0.05\%$)

Figura 7 - Avaliação da biomassa de biofilme de *Candida glabrata* tratado com os extratos glicólicos de *Pfaffia paniculata* e *Juglans regia* por 5 min, nas diferentes concentrações



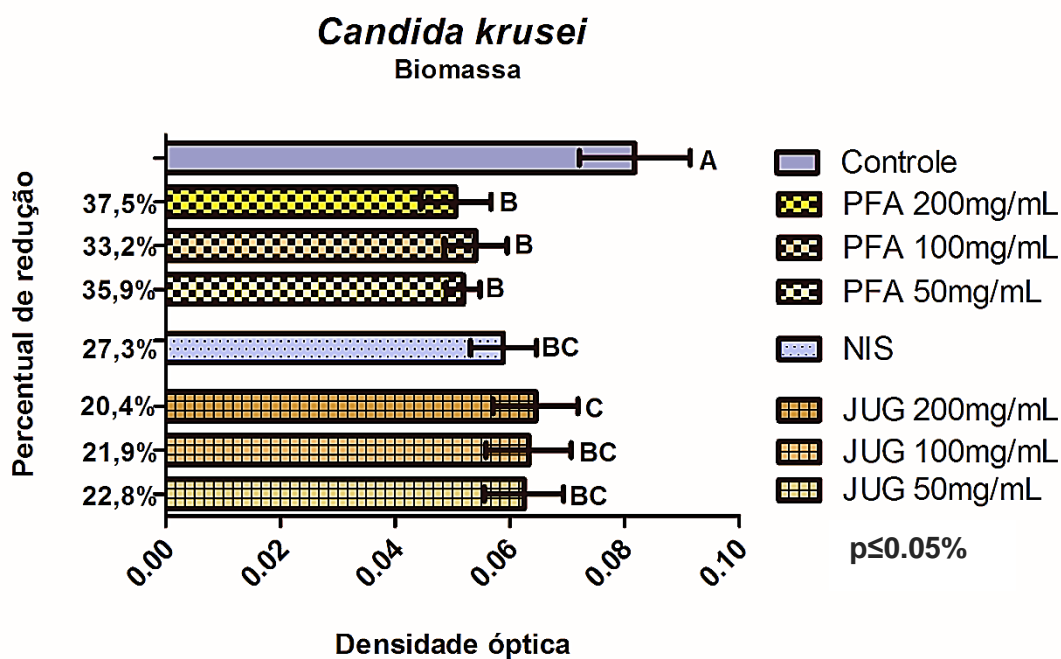
Legenda: PFA – Extrato glicólico de *Pfaffia paniculata*; JUG – Extrato glicólico de *Juglans regia*; NIS – Nistatina. Dados com distribuição normal analisados pelo teste ANOVA suplementado pelo teste de Tukey ($p \leq 0.05\%$)

Fonte: Elaborado pelo autor.

O extrato glicólico de *P. paniculata* também demonstrou ação antifúngica em biofilme de *C. krusei*, onde a concentração de 200 mg/mL reduziu em 37,5% sua biomassa, 100 mg/mL reduziu 33,2% e 50 mg/mL do extrato foi capaz de reduzir 35,9% da biomassa, valores observados na figura 8.

A biomassa de *C. krusei* foi reduzida em 20,4% com 200mg do extrato de *J. regia*, 100 mg reduziu 21,9% e 50 mg do extrato reduziu em 22,8% a biomassa do fungo. Todos os grupos exerceram redução com significância estatística ($p < 0.05$) comparados ao grupo controle de crescimento. O grupo nistatina obteve redução percentual de 27,3%. Quando comparados os grupos dos extratos e Nistatina entre si, a concentração de 200 mg de *J. regia* se demonstrou diferente quanto a redução estatística, promovendo uma menor redução da biomassa.

Figura 8 - Avaliação da biomassa de biofilme de *Candida krusei* tratado com os extratos glicólicos de *Pfaffia paniculata* e *Juglans regia* por 5 min, nas diferentes concentrações



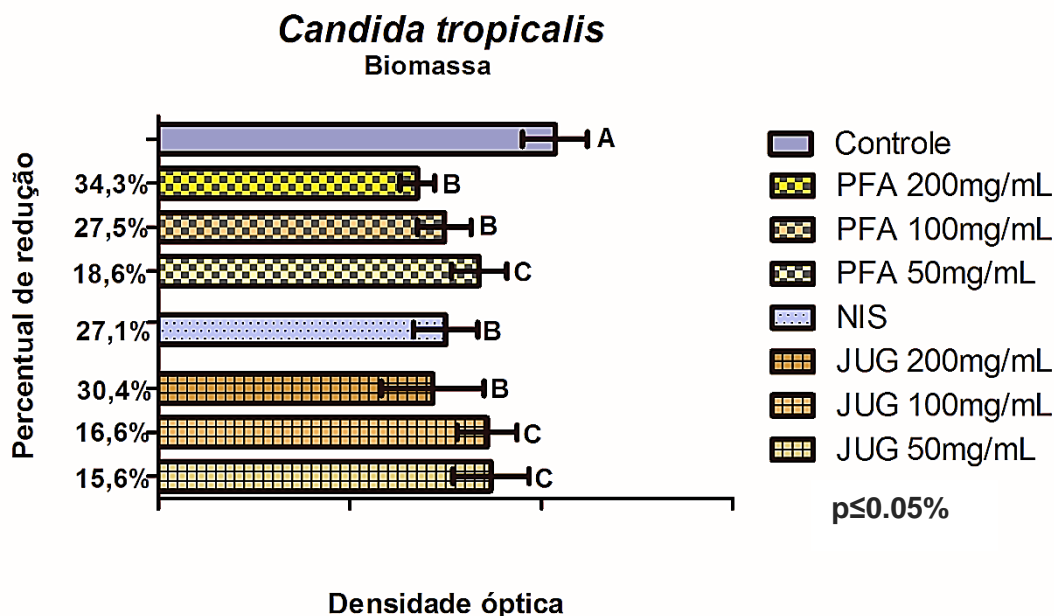
Legenda: PFA – Extrato glicólico de *Pfaffia paniculata*; JUG – Extrato glicólico de *Juglans regia*; NIS – Nistatina. Dados com distribuição normal analisados pelo teste ANOVA suplementado pelo teste de Tukey ($p \leq 0.05\%$)

Fonte: Elaborado pelo autor.

O extrato da raiz (*P. paniculata*) a 200 mg/mL reduziu a biomassa de *C. tropicalis* em 34,3%, a concentração de 100 mg/mL diminuiu 27,5% e 50 mg/mL 18,6%. Esses valores podem ser observados na figura 9. Todos os grupos apresentaram redução com significância estatística ($p < 0.05$) quando comparadas ao grupo controle, no entanto não há diferença significativa quando comparadas as concentrações de 200, 100 e 50 mg.

C. tropicalis teve sua biomassa reduzida em 30,4% com 200 mg do extrato de *J. regia*, 100 mg promoveu 16,6% de redução e 50 mg diminuiu 15,6% da biomassa do biofilme. Quando comparado ao grupo controle todos os grupos testes obtiveram redução com significância estatística ($p < 0.05$), a redução obtida pelo grupo 200 mg e nistatina foram maiores que a dos demais grupos.

Figura 9 - Avaliação da biomassa de biofilme de *Candida tropicalis* tratado com os extratos glicólicos de *Pfaffia paniculata* e *Juglans regia* por 5 min, nas diferentes concentrações



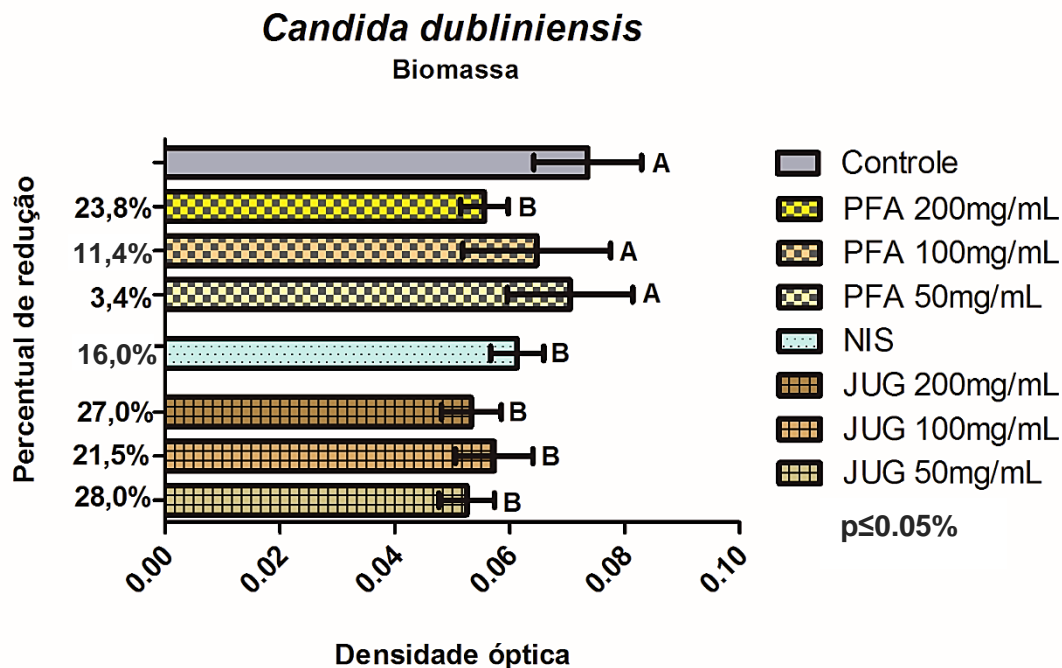
Legenda: PFA – Extrato glicólico de *Pfaffia paniculata*; JUG – Extrato glicólico de *Juglans regia*; NIS – Nistatina. Dados com distribuição normal analisados pelo teste ANOVA suplementado pelo teste de Tukey ($p \leq 0.05\%$)

Fonte: Elaborado pelo autor.

O extrato de *P. paniculata* reduziu o biofilme de *C. dubliniensis*, com significância estatística ($p < 0.05$) apenas na concentração de 200 mg/mL, atingindo 23,8%. As concentrações de 100 mg/mL e 50 mg/mL reduziram 11,4% e 3,4% respectivamente. Os valores podem ser observados na figura 10.

J. regia reduziu a biomassa de *C. dubliniensis* em 27,0%, 21,5% e 28,0% com as concentrações de 200 mg, 100 mg e 50 mg, respectivamente. Todas as concentrações obtiveram redução com significância estatística.

Figura 10 - Avaliação da biomassa de biofilme de *Candida dubliniensis* tratado com os extratos glicólicos de *Pfaffia paniculata* e *Juglans regia* por 5 min, nas diferentes concentrações

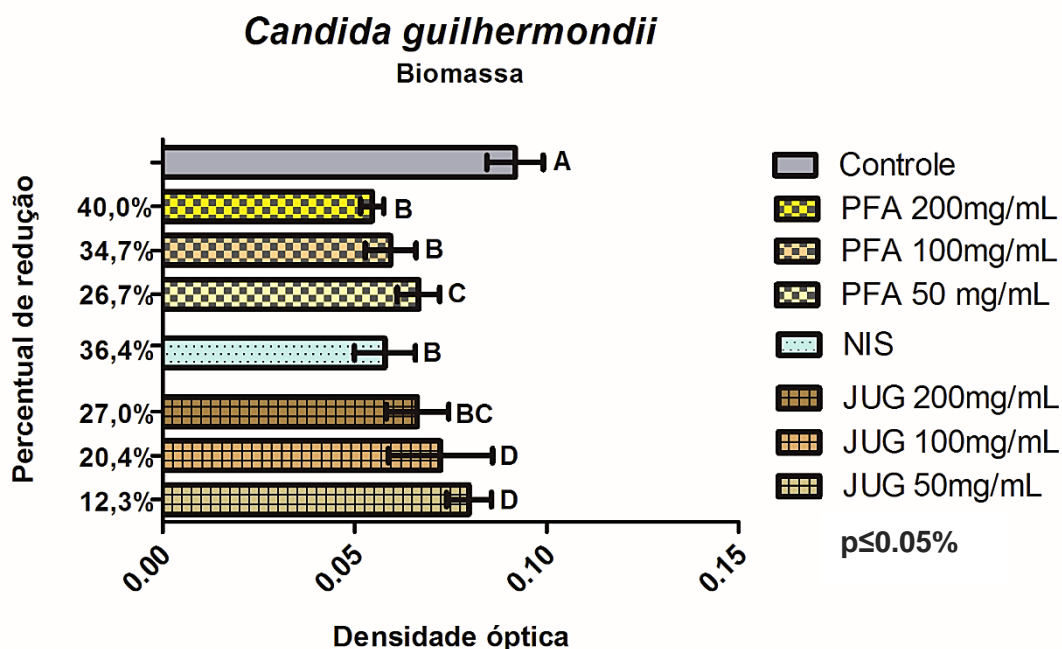


Legenda: PFA – Extrato glicólico de *Pfaffia paniculata*; JUG – Extrato glicólico de *Juglans regia*; NIS – Nistatina. Dados com distribuição normal analisados pelo teste ANOVA suplementado pelo teste de Tukey ($p \leq 0.05\%$)

Fonte: Elaborado pelo autor.

C. guilhermondii teve sua biomassa reduzida em 40,0% com 200 mg do extrato de *P. paniculata*, a concentração de 100 mg reduziu 34,7% e 50 mg/mL diminuiu 26,7% o biofilme. Todos os grupos obtiveram redução com significância estatística ($p < 0.05$) comparados ao grupo controle de crescimento. As concentrações de 200 mg/mL e 100 mg/mL e a solução de Nistatina foram semelhantes estatisticamente ($p < 0.05\%$) na capacidade de redução da biomassa. O extrato de *J. regia* promoveu a redução de 27,0%, 20,4% e 12,3% nas concentrações de 200 mg, 100 mg e 50 mg respectivamente. As reduções promovidas foram significantes estatisticamente ($p < 0.05$), comparadas ao grupo controle. Os resultados podem ser visualizados na figura 11.

Figura 11 - Avaliação da biomassa de biofilme de *Candida guilhermondii* tratado com os extratos glicólicos de *Pfaffia paniculata* e *Juglans regia* por 5 min, nas diferentes concentrações



Legenda: PFA – Extrato glicólico de *Pfaffia paniculata*; JUG – Extrato glicólico de *Juglans regia*; NIS – Nistatina. Dados com distribuição normal analisados pelo teste ANOVA suplementado pelo teste de Tukey ($p \leq 0,05\%$)

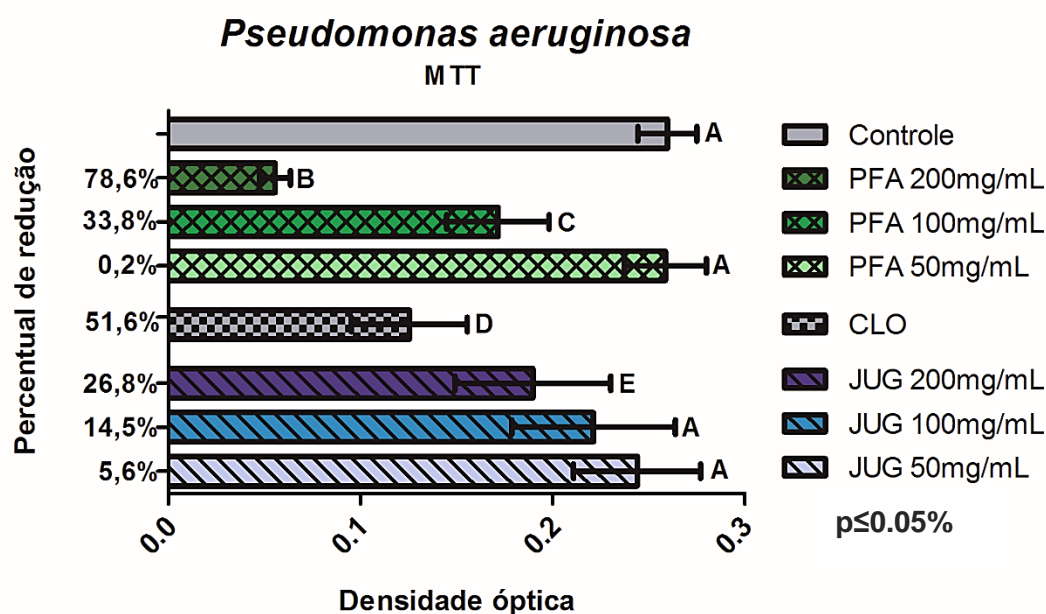
Fonte: Elaborado pelo próprio autor.

4.1.3 Avaliação da atividade metabólica dos micro-organismos em biofilme após exposição aos extratos

A concentração de 200 mg/mL do extrato de *P. paniculata* reduziu a atividade metabólica de *P. aeruginosa* em 78,6%, já 100 mg/mL apresentou a diminuição de 33,8% e 50 mg/mL apenas 0,2%. O tratamento padrão realizado com digluconato de clorexidina a 0,12% promoveu a redução de 51,6% do metabolismo de redutases da bactéria. Os grupos 200 mg/mL, 100 mg/mL e Clorexidina obtiveram redução estatística significante ($p < 0,05$) comparado ao grupo controle de crescimento. Conforme observado na figura 12.

O extrato de *J. regia* na concentração de 200 mg promoveu a redução de 26,8% da viabilidade de *P. aeruginosa*. A concentração de 100 mg promoveu redução de 14,5% e 50 mg 5,6%. Apenas os grupos 200 mg e clorexidina obtiveram redução com significância estatística ($p < 0.05$) em comparação ao controle, sendo que clorexidina obteve redução percentual de 51,6%.

Figura 12 - Avaliação da atividade metabólica de *Pseudomonas aeruginosa* tratado com os extratos glicólicos de *Pfaffia paniculata* e *Juglans regia* por 5 min, nas diferentes concentrações



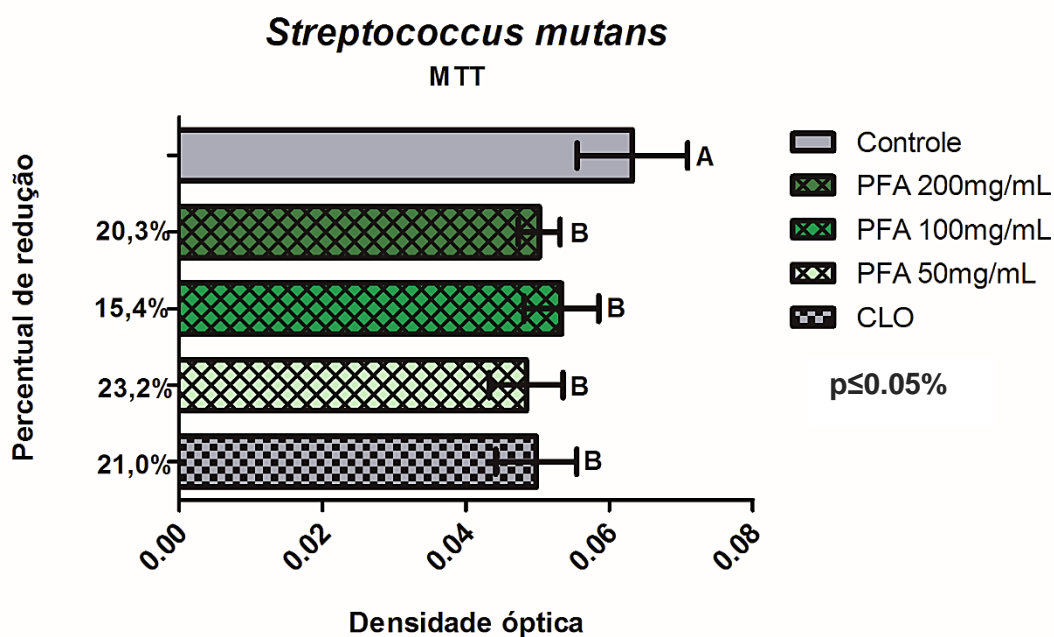
Legenda: PFA – Extrato glicólico de *Pfaffia paniculata*; JUG – Extrato glicólico de *Juglans regia*; CLO – Digluconato de Clorexidina 0,12%. Dados com distribuição normal analisados pelo teste ANOVA suplementado pelo teste de Tukey ($p \leq 0.05\%$)

Fonte: Elaborado pelo próprio autor.

S. mutans teve sua atividade metabólica diminuída em 20,3% quando exposto a 200 mg/mL do extrato de *P. paniculata*; A concentração de 100 mg/mL diminuiu 15,4% e 50 mg/mL promoveu a queda do metabolismo enzimático em 23,2%. Resultados semelhantes aos encontrados com digluconato de clorexidina a 0,12%, que apresentou a diminuição de 21,0%. Todos os grupos

comparados ao controle apresentaram redução com significância estatística ($p < 0.05$), conforme observado na figura 13.

Figura 13 - Avaliação da atividade metabólica de *Streptococcus mutans* tratado com o extrato glicólico de *Pfaffia paniculata* por 5 min, nas diferentes concentrações



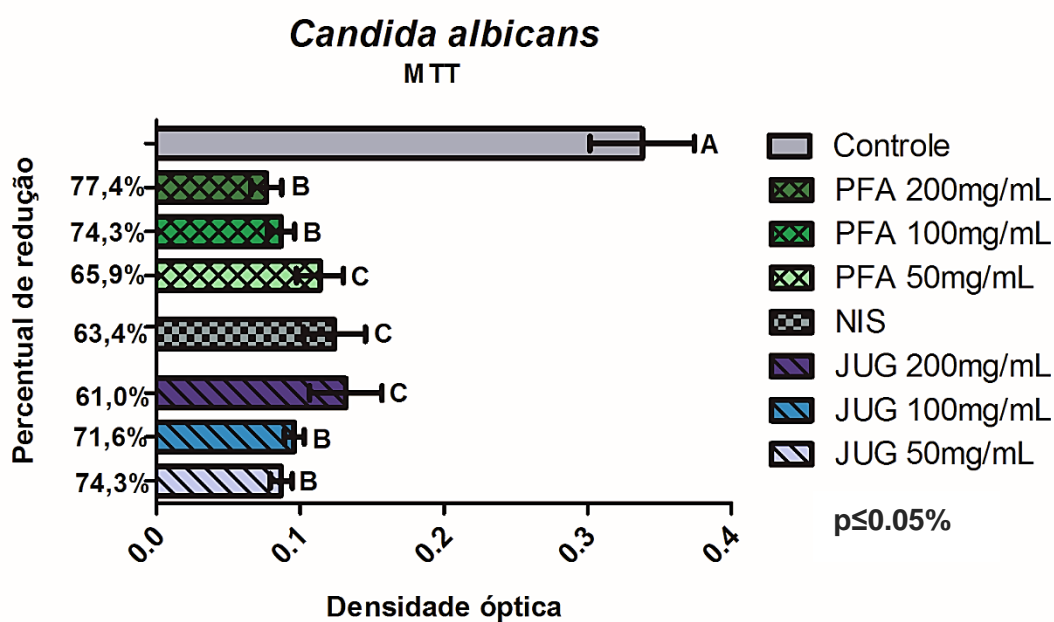
Legenda: PFA – Extrato glicólico de *Pfaffia paniculata*; CLO – Diglucunato de Clorexidina 0,12%.
Dados com distribuição normal analisados pelo teste ANOVA suplementado pelo teste de Tukey ($p \leq 0.05\%$)

Fonte: Elaborado pelo próprio autor.

O teste de atividade metabólica aplicado a *C. albicans* demonstrou que 77,4% do biofilme foi reduzido quando foi aplicado 200 mg/mL do extrato da raiz (*P. paniculata*). O grupo tratado com 100 mg/mL reduziu 74,3% e o grupo de 50 mg/mL reduziu 65,9%. Nistatina reduziu a viabilidade celular do fungo em 63,4%, como pode ser observado na figura 14.

J. regia reduziu percentualmente o metabolismo enzimático de *C. albicans* em 61,0%, 71,6% e 74,3% nas concentrações de 200 mg, 100 mg e 50 mg respectivamente. Os resultados foram similares ao encontrado com nistatina com redução de 63,3%. Todos os grupos obtiveram redução significativa estatisticamente ($p < 0.05$), comparados ao grupo controle.

Figura 14 - Avaliação da atividade metabólica de *Candida albicans* tratado com os extratos glicólicos de *Pfaffia paniculata* e *Juglans regia* por 5 min, nas diferentes concentrações



Legenda: PFA – Extrato glicólico de *Pfaffia paniculata*; JUG – Extrato glicólico de *Juglans regia*; NIS - Nistatina. Dados com distribuição normal analisados pelo teste ANOVA suplementado pelo teste de Tukey ($p \leq 0.05\%$)

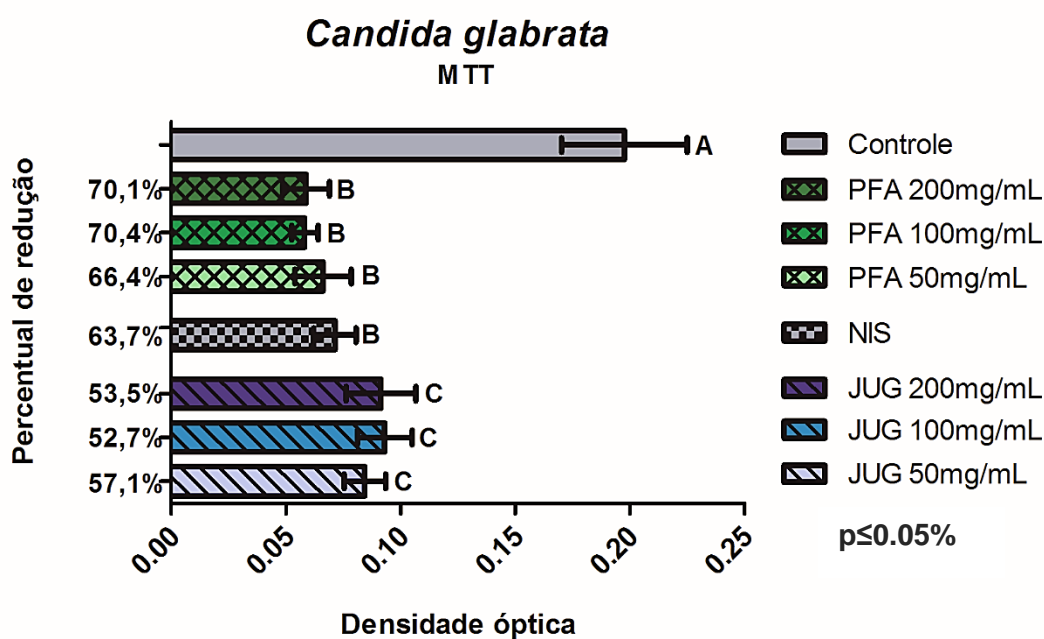
Fonte: Elaborado pelo próprio autor.

C. glabrata teve sua atividade metabólica diminuída em 70,1% quando exposta ao extrato de *P. paniculata* na concentração de 200 mg, a concentração de 100 mg reduziu 70,4% do fungo e 50 mg/mL obteve a redução de 66,4% . Nistatina se manteve no mesmo nível de redução promovida pelas diferentes

concentrações do extrato, com reduções significativas estatisticamente ($p < 0.05$), em comparação ao grupo controle.

J. regia reduziu a atividade metabólica de *C. glabrata* em 53,5%, 52,7% e 57,1% com as concentrações de 200 mg, 100 mg e 50 mg respectivamente, nistatina reduziu 63,7%. Todas as concentrações obtiveram redução com significância estatística ($p < 0.05$), em relação ao controle. Os dados podem ser observados na figura 15.

Figura 15 - Avaliação da atividade metabólica de *Candida glabrata* tratado com os extratos glicólicos de *Pfaffia paniculata* e *Juglans regia* por 5 min, nas diferentes concentrações



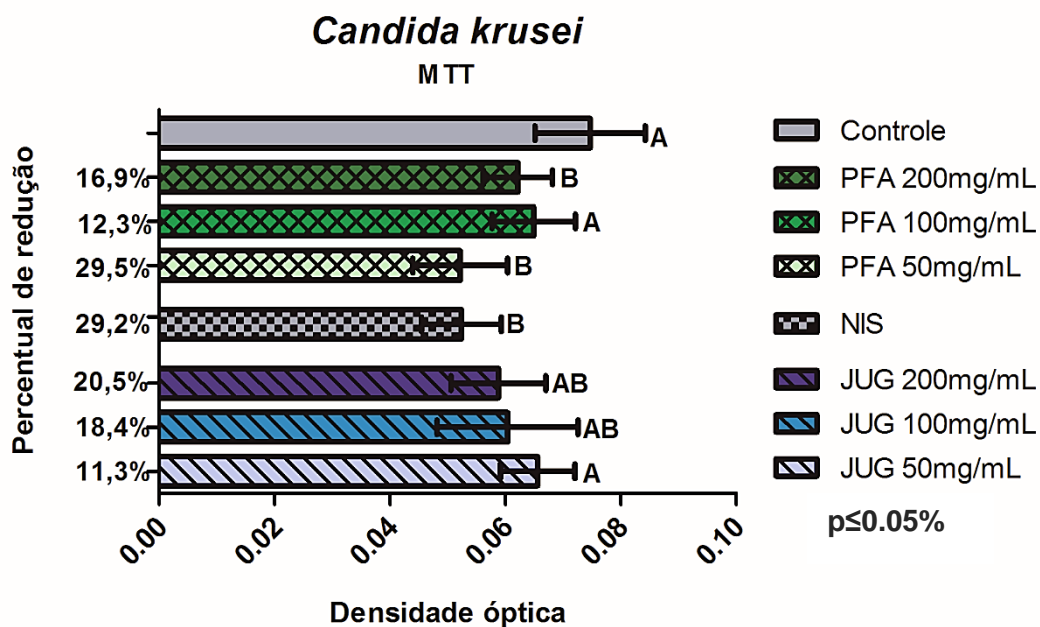
Legenda: PFA – Extrato glicólico de *Pfaffia paniculata*; JUG – Extrato glicólico de *Juglans regia*; NIS – Nistatina. Dados com distribuição normal analisados pelo teste ANOVA suplementado pelo teste de Tukey ($p \leq 0.05\%$)

Fonte: Elaborado pelo próprio autor.

As concentrações de 200 mg, 100 mg e 50 mg reduziram o metabolismo de *C. krusei* em 16,9%, 12,3% e 29,5%, respectivamente. Comparado ao grupo controle de crescimento, apenas as concentrações de 200mg e 100mg promoveram redução significativa estatisticamente ($p < 0.05$), como pode ser observado na figura 16.

As concentrações de 200 mg, 100 mg e 50 mg de *J. regia* promoveram a redução percentual no metabolismo de *C. krusei* em 20,5%, 18,4% e 11,3%, respectivamente. As concentrações de 200 mg e 100 mg obtiveram redução com significância estatística ($p < 0.05$), comparados ao grupo controle.

Figura 16 - Avaliação da atividade metabólica de *Candida krusei* tratado com os extratos glicólicos de *Pfaffia paniculata* e *Juglans regia* por 5 min, nas diferentes concentrações



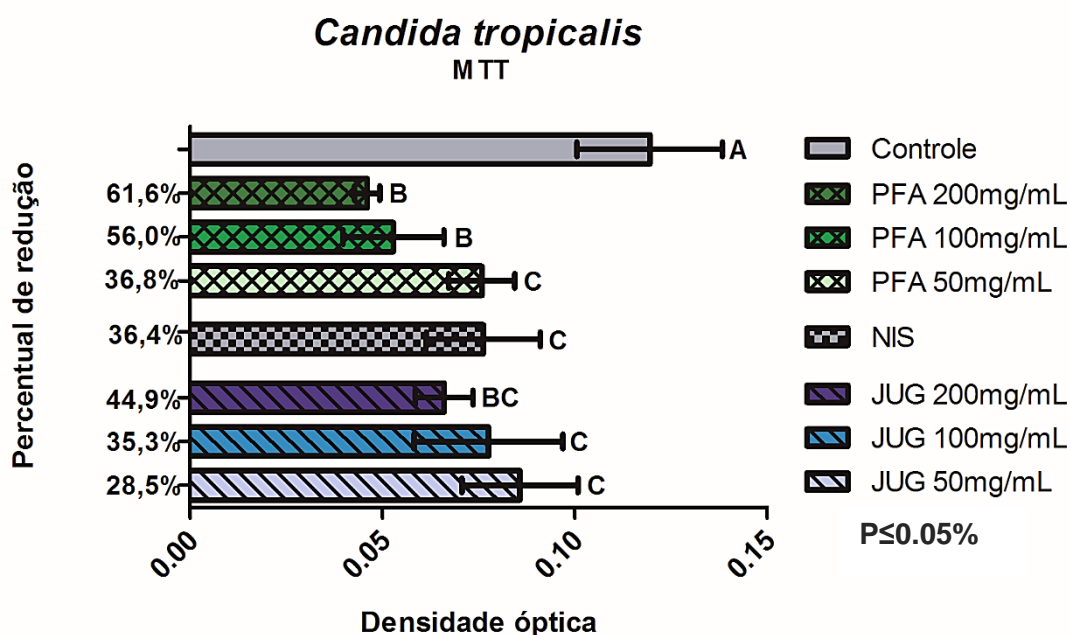
Legenda: PFA – Extrato glicólico de *Pfaffia paniculata*; JUG – Extrato glicólico de *Juglans regia*; NIS – Nistatina. Dados com distribuição normal analisados pelo teste ANOVA suplementado pelo teste de Tukey ($p \leq 0.05\%$)

Fonte: Elaborado pelo próprio autor.

As células de *Candida tropicalis* tiveram seu metabolismo alterado quando expostas ao extrato de *P. paniculata* a 200 mg/ml, 100 mg/mL e 50mg/mL, com redução de 61,6%, 56,0% e 36,8% respectivamente, conforme pode ser observado na figura 17.

C. tropicalis teve sua atividade metabólica reduzida em 44,9% com o extrato de *J. regia* a 200 mg, conforme mostra a figura 14. As concentrações de 100 mg e 50 mg proporcionaram redução da viabilidade em 35,3% e 28,5%. Nistatina teve percentual de redução de 36,4%. Os dois extratos obtiveram reduções com significância estatística ($p < 0.05$), comparados ao grupo controle.

Figura 17 - Avaliação da atividade metabólica de *Candida tropicalis* tratado com os extratos glicólicos de *Pfaffia paniculata* e *Juglans regia* por 5 min, nas diferentes concentrações



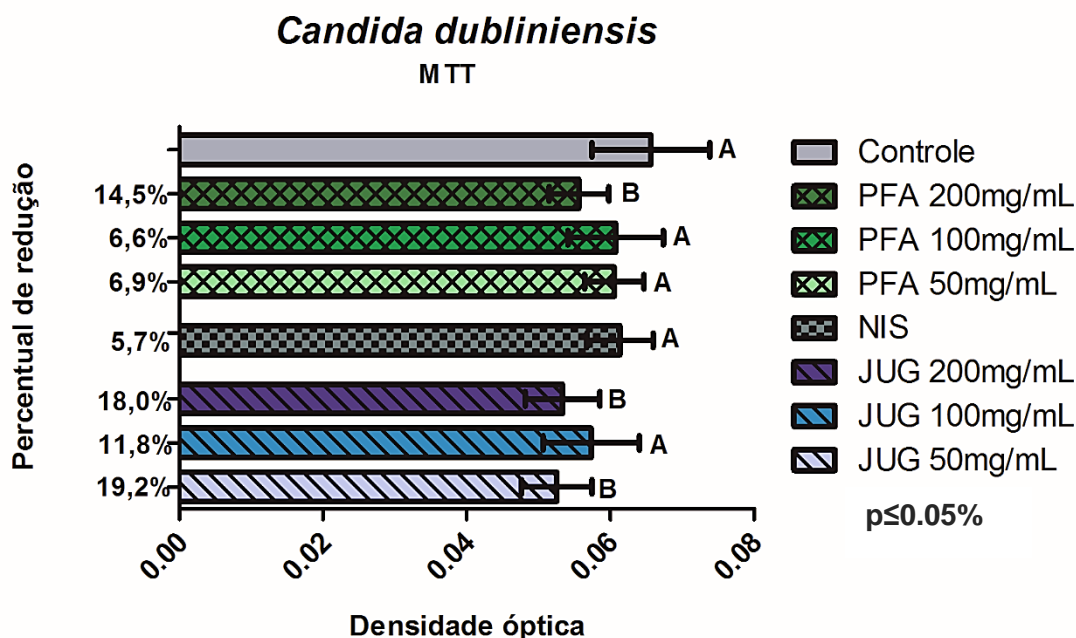
Legenda: PFA – Extrato glicólico de *Pfaffia paniculata*; JUG – Extrato glicólico de *Juglans regia*; NIS – Nistatina. Dados com distribuição normal analisados pelo teste ANOVA suplementado pelo teste de Tukey ($p \leq 0.05\%$)

Fonte: Elaborado pelo próprio autor.

Para *C. dubliniensis* apenas a concentração de 200 mg/mL do extrato de *P. paniculata* resultou em uma redução com significância estatística ($p < 0.05$), com 14,5% de redução do metabolismo do fungo. O extrato nas concentrações de 100 mg e 50 mg, reduziram a viabilidade em 6,6% e 6,9% respectivamente, as duas concentrações não obtiveram redução com significância estatística ($p < 0.05$).

C. dubliniensis teve sua atividade metabólica reduzida em 18,0% com 200 mg do extrato de *J. regia*, 100 mg reduziu 11,8% e 19,2% foi a redução promovida por 50 mg. Apenas a concentração de 100 mg de *J. regia* não causou redução com significância estatística ($p < 0.05$), comparados ao grupo controle. Os valores estão indicados na figura 18.

Figura 18 - Avaliação da atividade metabólica de *Candida dubliniensis* tratado com os extratos glicólicos de *Pfaffia paniculata* e *Juglans regia* por 5 min, nas diferentes concentrações



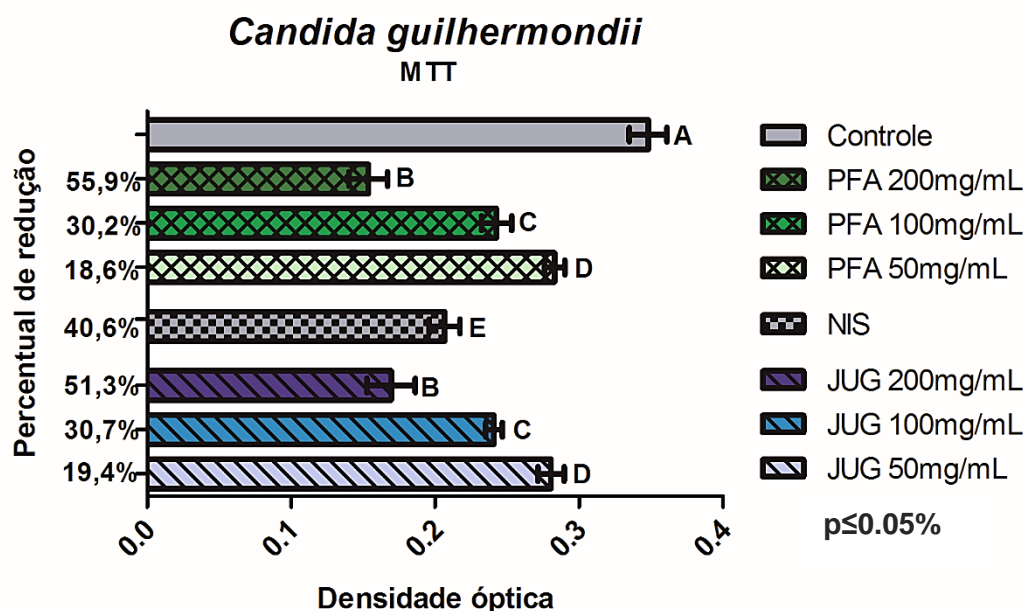
Legenda: PFA – Extrato glicólico de *Pfaffia paniculata*; JUG – Extrato glicólico de *Juglans regia*; NIS – Nistatina. Dados com distribuição normal analisados pelo teste ANOVA suplementado pelo teste de Tukey ($p \leq 0.05\%$)

Fonte: Elaborado pelo próprio autor.

Com 55,9% de redução, o grupo de 200 mg do extrato de *P. paniculata* obteve a maior redução com significância estatística ($p < 0.05$). Os demais grupos apresentaram 30,2% com 100 mg e 50 mg ocasionou 18,6% de redução do metabolismo de *C. guilhermondii*. Todas as concentrações apresentaram redução com diferença estatística ($p < 0.05\%$) comparados ao grupo controle.

Candida guilhermondii apresentou 51,3% de redução em sua atividade metabólica com a maior concentração do extrato, 200 mg. Cem (100) mg promoveu a diminuição de 30,7% e 50 mg diminuiu 19,4%. Nistatina apresentou percentual de redução de 40,6% e todos os grupos demonstraram redução com significância estatística ($p < 0.05$) com relação ao grupo controle.

Figura 19 - Avaliação da atividade metabólica de *Candida guilhermondii* tratado com os extratos glicólicos de *Pfaffia paniculata* e *Juglans regia* por 5 min, nas diferentes concentrações



Legenda: PFA – Extrato glicólico de *Pfaffia paniculata*; JUG – Extrato glicólico de *Juglans regia*; NIS – Nistatina. Dados com distribuição normal analisados pelo teste ANOVA suplementado pelo teste de Tukey ($p \leq 0.05\%$)

Fonte: Elaborado pelo próprio autor.

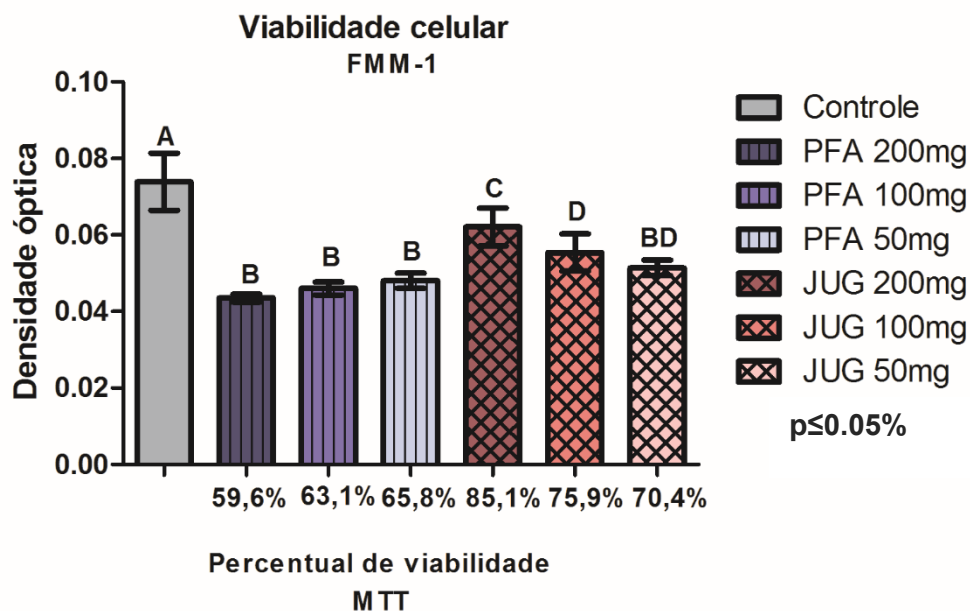
4.2 Citotoxicidade dos princípios ativos

4.2.1 Avaliação da Citotoxicidade pelo teste de MTT

Os extratos de *P. paniculata* e *J. regia* não demonstraram ação citotóxica em células da linhagem FMM-1 (Fibroblastos gengivais humanos), considerando toxicidade celular os resultados abaixo do limiar de 50% de viabilidade. Com 5 min de aplicação, a concentração de 200 mg do extrato de *P. paniculata* resultou em 59,6% de células viáveis, 100 mg obteve 63,1% e 50 mg do extrato resultou em 65,8% da viabilidade dos fibroblastos. O extrato de *J. regia* obteve 85,1% de viabilidade com a exposição de 200 mg do extrato por 5 min, já 100 mg obteve 75,9% da viabilidade e 50 mg obteve 70,4%. Os valores podem ser observados na Figura 20.

Todos os grupos testes obtiveram redução estatisticamente significativa ($p < 0.05\%$) em relação ao grupo controle.

Figura 20 - Avaliação da viabilidade de fibroblastos gengivais humanos (FMM-1) pelo teste de MTT após exposição por 5 min aos extratos de *P. paniculata* e *J. regia* em diferentes concentrações



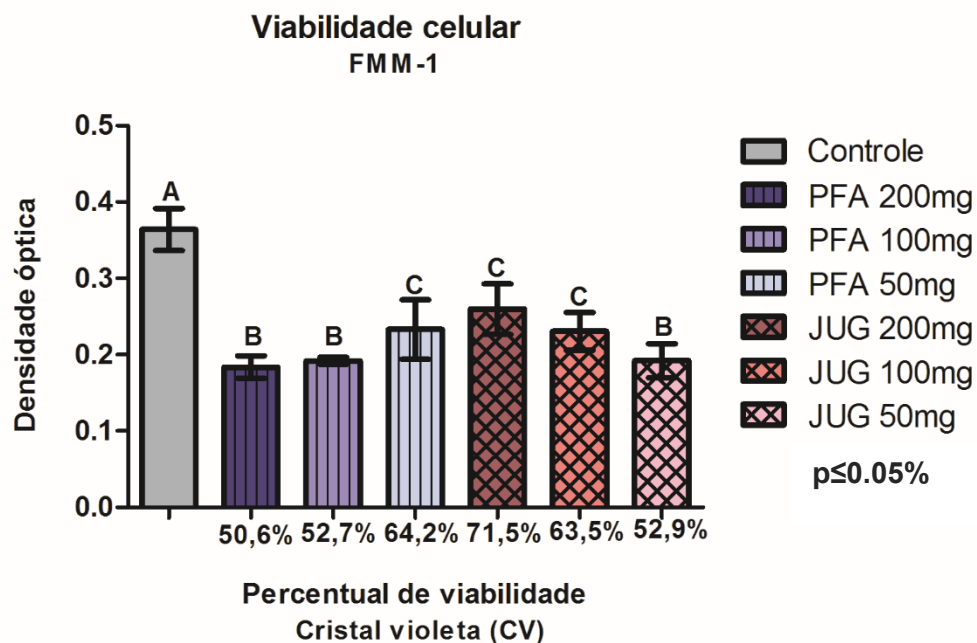
Legenda: PFA – Extrato glicólico de *Pfaffia paniculata*; JUG – Extrato glicólico de *Juglans regia*. Dados com distribuição normal analisados pelo teste ANOVA suplementado pelo teste de Tukey ($p \leq 0.05\%$)

Fonte: Elaborado pelo próprio autor.

4.2.2 Avaliação da Citotoxicidade pelo teste do Cristal Violeta

Após a aplicação do extrato de *P. paniculata* na concentração de 200 mg resultou na viabilidade de 50,6% dos fibroblastos, 100 mg do extrato resultou em 52,7% e a concentração de 50 mg resultou em 64,2% da viabilidade celular. O extrato de *J. regia* na concentração de 200 mg resultou em 71,5%, 100 mg resultou em 63,5% e 50 mg resultou em 52,9% de viabilidade celular. Os valores obtidos pelos grupos testes obtiveram redução estatisticamente significativa ($p < 0.05\%$) comparados ao grupo controle e podem ser observados na figura 21.

Figura 21 - Avaliação da viabilidade de fibroblastos gengivais humanos (FMM-1) pelo teste de cristal violeta após exposição por 5 min aos extratos de *P. paniculata* e *J. regia* em diferentes concentrações



Legenda: PFA – Extrato glicólico de *Pfaffia paniculata*; JUG – Extrato glicólico de *Juglans regia*.
Dados com distribuição normal analisados pelo teste ANOVA suplementado pelo teste de Tukey (p ≤ 0.05%)

Fonte: Elaborado pelo próprio autor.

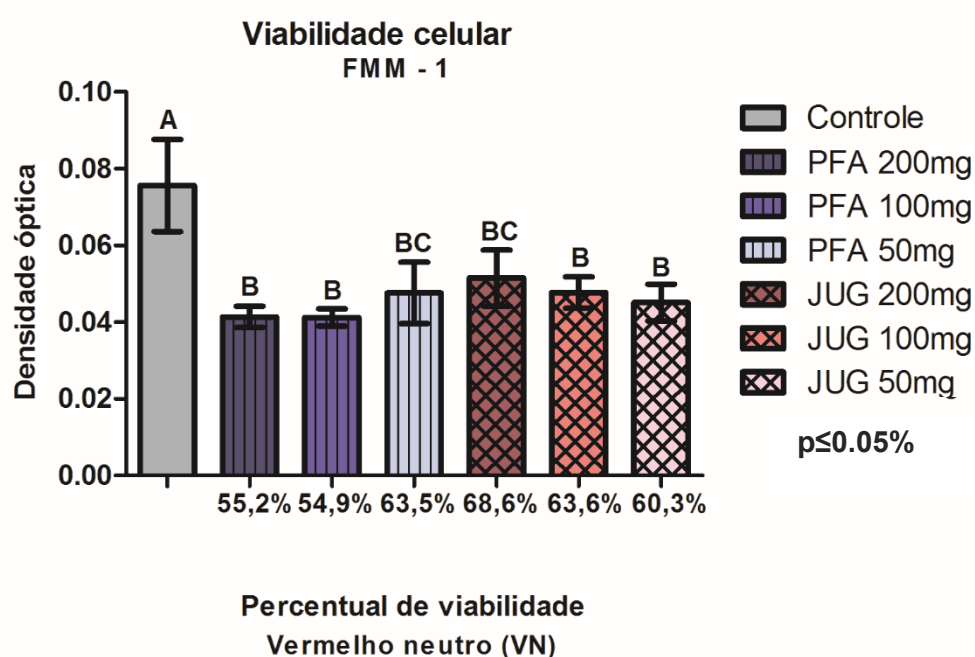
4.2.3 Avaliação da Citotoxicidade pelo teste do Vermelho neutro

Através da atividade lisossomal da célula, a aplicação dos extratos de *P. paniculata* e *J. regia* não demonstrou citotoxicidade, considerando toxicidade valores abaixo de 50% de viabilidade celular. Após aplicação do extrato de *P. paniculata* na concentração de 200 mg a viabilidade celular resultou em 55,2%, 100 mg resultou em 54,9% e 50 mg do extrato resultou em 63,5% de viabilidade.

Após a aplicação do extrato de *J. regia* com 200 mg/mL, por 5 min, a viabilidade celular se manteve em 68,6%, 100 mg resultou em 63,6% e 50 mg

resultou em 60,3% da viabilidade celular. Os valores obtidos pelos grupos testes obtiveram redução estatisticamente significativa ($p < 0.05\%$) comparados ao grupo controle. Os valores podem ser observados na Figura 22.

Figura 22 - Avaliação da viabilidade de fibroblastos gengivais humanos (FMM-1) pelo teste de vermelho neutro após exposição por 5 min aos extratos de *Pfaffia paniculata* e *Juglans regia* em diferentes concentrações



Legenda: PFA – Extrato glicólico de *Pfaffia paniculata*; JUG – Extrato glicólico de *Juglans regia*.
Dados com distribuição normal analisados pelo teste ANOVA suplementado pelo teste de Tukey ($p \leq 0.05\%$)

Fonte: Elaborado pelo próprio autor.

5 DISCUSSÃO

Os resultados entre os testes de MTT e biomassa (CV) demonstraram um grande potencial antimicrobiano de *P. paniculata* e *Juglans regia*, com destaque aos efeitos sobre fungos, que se mostraram mais sensíveis a aplicação dos extratos.

Inicialmente analisando os grupos controle de crescimento, foi possível notar que as algumas espécies de *Candida* apresentavam maiores índices de biomassa (CV), outras apresentavam altos índices de atividade metabólica (MTT).

Neste estudo os biofilmes de *C. krusei* e *C. dubliniensis* demonstraram maior produção de biomassa, porém esse resultado difere do encontrado por Marcos-Zambrano et al. (2014), onde a comparação entre o teste de XTT e biomassa (CV) apontaram que as espécies *C. tropicalis* e *C. albicans* apresentavam maior biomassa. Para *C. glabrata* os resultados entre os estudos foram semelhantes, onde foi indicado que a espécie possui uma maior atividade metabólica do que um biofilme denso.

Reforçando os resultados deste estudo, Costa AC et al. (2013) também apontam que nos testes de biomassa, o biofilme de *C. glabrata* apresenta uma menor densidade comparado a outras espécies de *Candida*, isso se deve a composição do biofilme da espécie que conta apenas com as células da levedura e a matriz polimérica, sem a presença de hifas ou pseudohifas.

Os estudos que avaliam a ação antimicrobiana de *P. paniculata* são escassos, sendo este estudo pioneiro na avaliação da ação antimicrobiana do extrato glicólico desta raiz.

Comparando os dados obtidos neste estudo, *C. albicans*, *C. glabrata*, *C. tropicalis* e *C. guilhermondii* obtiveram maiores reduções no teste de atividade

metabólica. Em contrapartida os resultados com *C. krusei* demonstraram que o extrato causou maior redução na biomassa da espécie.

C. dubliniensis demonstrou um resultado variável na comparação entre os testes (CV x MTT) conforme a concentração do extrato. As concentrações de 200 mg e 100 mg demonstraram maior ação na biomassa da espécie porém a concentração de 50 mg mostrou maior ação sobre a atividade enzimática do micro-organismo com maior redução no metabolismo celular.

Para a espécie *C. krusei* a menor concentração testada do extrato (50 mg) foi capaz de promover maior ação, tanto no teste de atividade metabólica como no teste de avaliação da biomassa.

Uma das possíveis hipóteses para esta ação do extrato sobre a célula do fungo está relacionado ao principal constituinte de *P. paniculta*. A raiz possui uma grande gama de saponinas denominadas pfafosídeos, são 6 tipos classificados em grupos (A,B,C,D,E e F) que foram identificados por vários autores.

As saponinas (glicosídeos) são triterpenos glicosilados, essa glicosilação geralmente é composta por 5 moléculas de açúcares, essas cadeias de açúcares são capazes de interagir com esteróis presentes na membrana celular dos fungos, a interação saponina – esteróis promove rearranjos na estrutura do fungo modificando a permeabilidade dessa estrutura (Morrissey, Osbourn, 1999, Pham et al., 2015; Costa Ca et al., 2015; Coêlho et al., 2016, Silva et al., 2015). Mais recentemente Pham et al. (2015) também avaliaram a ação biológica de monoterpenos sobre a bicamada lipídica, concluindo que essas moléculas possuem a capacidade de alterar a fluidez e o carregamento de substâncias através da bicamada lipídica.

Comparando os dados indicados por Morrissey e Osbourn (1999) e Pham et al. (2015), a respeito das saponinas, com os resultados antimicrobianos obtidos por este estudo, as moléculas de pfafosídeos parecem ter mais efeitos

sobre células fungicas do que bacterianas, isso leva a crer que a interação saponina – esteróis deve estar mais ligada ao ergosterol, esterol presente nas membrana de fungos, do que ao colesterol, esterol presente na membrana de bactérias.

Outro ponto importante que deve ser explorado a respeito das saponinas (pfafosídeos) deve-se ao fato da difusão desta molécula sobre o biofilme das espécies de *Candida*, os resultados antimicrobianos deste estudo se mostraram muito importantes, devido a grande redução de biofilmes após aplicação dos extratos. As saponinas portanto parecem possuir um bom poder de difusão já que as diferentes espécies de *Candida* possuem biofilmes muito estruturados e por vezes densos. Essa ação pode estar ligada aos componentes dos biofilmes de *Candida*, Costa AC et al. (2013) indicou que a matriz do biofilme de *C. albicans* é composta por 39,6% de carboidratos, já *C. tropicalis* possui uma matriz 27,4% de hexosamina. Araujo e colaboradores (2017) apontaram que os biofilmes de *C. tropicalis* e *C. glabrata* também possuem carboidratos em sua composição. Devido a estes apontamentos, o poder de permeabilidade da saponina deve estar ligado ao fato dos biofilmes de *Candida* spp requererem grandes níveis de açúcares em sua composição e as saponinas, por ser um glicosídeo, possuem açúcares em sua constituição sendo sua difusão facilitada pelo biofilme.

Os resultados obtidos com bactérias não foram tão promissores. No teste de microdiluição o extrato de *P. paniculata* demonstrou ação em apenas duas das cinco bactérias testadas, sendo elas *P. aeruginosa* e *S. mutans*. Os testes em biofilmes indicaram que a atividade metabólica de *P. aeruginosa* foi mais afetado do que a biomassa da mesma, sendo sua viabilidade reduzida em 33,8%. Já *S. mutans* obteve redução de 15,4% em sua viabilidade porém a diferença entre os danos causados à viabilidade do micro-organismo ou a biomassa são indiferentes, sendo a redução da biomassa de 15,6%.

Como a atuação das saponinas está mais relacionada aos componentes da membrana celular de fungos (estéroides), muito provavelmente ao ergosterol, elas não apresentam efeitos sobre bactérias já que as mesmas não possuem esses constituintes. Portanto, o efeito do extrato de *P. paniculata* sobre *S. mutans* e *P.aeruginosa* deve estar relacionado a outras moléculas constituintes do extrato em menor quantidade. Dentre as moléculas estão a alantoína, sitosterol, polifenóis e β -ecdisterona. Alguns polifenóis como a vitamina E (alfa tocoferol) possuem ação antimicrobiana, apesar de pouco elucidada sua exata ação; parece ocasionar danos a membrana celular, degradação de enzimas e bloqueio da síntese de ATPs. Os outros compostos foram descritos na literatura com efeitos anti-oxidantes e anti-inflamatórios (Rauha et al., 2000; Sánchez et al., 2010; Joshan et al., 2013; Altemimi et al., 2015).

Os testes que avaliam a toxicidade do extrato de *Pfaffia paniculata* através da avaliação de estruturas celulares, atividade metabólica ou mesmo teste de dose letal são escassos; muitos estudos partem do conhecimento popular e avaliam apenas o efeito anti-inflamatório do extrato.

O presente estudo avaliou a ação do extrato glicólico de *P. paniculata* sobre células da linhagem FMM -1, onde as concentrações de 200 mg, 100 mg e 50 mg se mostraram tóxicas, com valores de viabilidade celular abaixo de 70%.

Os testes colorimétricos de Cristal violeta, MTT e Vermelho neutro aplicados na linhagem FMM-1 mostraram resultados coesos, não demonstrando que nenhuma organela ou mesmo o DNA tenha sofrido maior dano causado pelo extrato; todas se mantiveram em um mesmo perfil de redução. Os valores de redução de viabilidade versus a concentração do extrato se mantiveram em valores esperados, sendo a maior concentração do extrato mais tóxica a célula.

Apesar dos resultados *in vitro* do presente trabalho, mostrarem que os componentes do extrato apresentaram toxicidade nas concentrações testadas, a

aplicação do mesmo já parece ser bem disseminada pela comunidade científica e também pelo uso popular.

A média obtida entre os três testes de viabilidade celular em FMM-1 indicaram que após o contato com a concentração de 200 mg do extrato a viabilidade celular se manteve em 55,1%, 100 mg obteve viabilidade de 56,9% e 50 mg de 65,5%. Estes resultados foram considerados tóxicos segundo as diretrizes de toxicidade, porém Mozar et al. (2015) verificaram que quando aplicado em hemácias o extrato não causou nenhum malefício. Os pesquisadores indicaram que o extrato foi capaz de aumentar a vida útil de células com deformidades estruturais, como exemplo as células falcêmicas.

Eberlin et al. (2009) utilizaram em 21 pacientes um dermocosmético, à base de *P. paniculata* e outras duas plantas (*Ptychopetalum olacoides* B. e *Lilium candidum* L) para avaliar a capacidade do mesmo em reduzir manchas escuras ao redor dos olhos. O cosmético se mostrou eficaz em 90% dos casos e não causou nenhuma reação adversa em qualquer paciente, contrapondo, mais uma vez, os resultados de toxicidade deste estudo.

Considerando os dados expostos acima em conjunto aos resultados antimicrobianos e citotóxicos obtidos no presente estudo, o extrato glicólico de *P. paniculata* demonstrou possuir uma ação antimicrobiana eficaz a algumas espécies testadas. No entanto o extrato se mostraram tóxicos seguindo as novas diretrizes de toxicidade, contudo há muitos pontos a se confrontar, inclusive a relação entre testes *in vitro* e *in vivo*. O importante a se salientar é que os resultados antimicrobianos demonstraram uma importante ação antifúngica do extrato de *P. paniculata*, sendo de grande valia para o desenvolvimento de um novo fármaco.

O presente estudo verificou que o extrato de *J. regia* demonstrou importante ação antimicrobiana dentre as cepas de micro-organismos testadas. O extrato se mostrou mais eficaz no combate a fungos, segundo os testes

realizados em biofilme. Comparando os resultados do teste de CV e MTT entre os fungos, foi observado que *C. albicans*, *C. glabrata*, *C. tropicalis* e *C. guilhermondii* obtiveram maior dano em sua atividade metabólica, indicando que o extrato causou danos ao arsenal de enzimas dos microorganismos ou mesmo as estruturas que as produzem.

Diferentemente das outras espécies *C. krusei* e *C. dubliniensis* demonstraram maior redução da biomassa após a aplicação do extrato, demonstrando que o extrato parece possuir mais ação sobre a matriz polissacarídica do seu biofilme do que a sua estrutura celular propriamente dita.

Dentre as cinco bactérias testadas apenas *P. aeruginosa* se mostrou sensível a aplicação do extrato. Curiosamente a concentração do extrato mostrou interferir no local de ação do extrato e no potencial de redução. A concentração de 200 mg do extrato de *J. regia* causou maiores danos a viabilidade celular da bactéria, entretanto as concentrações de 100 mg e 50 mg causaram maiores danos a biomassa de *P. aeruginosa*. Isso sugere que a substância responsável por causar danos à estrutura do fungo se perde após a diluição do extrato, passando outros componentes a interagirem em outros sítios da bactéria.

Apesar dos pequeno potencial antibacteriano demonstrado neste estudo, muitos dos trabalhos envolvendo o extrato de *J. regia* avaliam sua ação sobre bactérias.

Nostro et al. (2016) avaliaram a ação antimicrobiana da folha de *J. regia.*, através do teste de disco difusão em ágar. Os pesquisadores obtiveram CIM com 5000 µg/mL (5 mg/mL) com o extrato metanólico para *P. aeruginosa* (ATCC 9027) e 2500 µg/mL (2,5 mg/mL) para *S. aureus* (ATCC 6538P). Os valores divergem dos resultados encontrados no presente estudo onde *P. aeruginosa* obteve CIM com 25 mg e *S. aureus* apresentou CIM com 50 mg.

Em relação a CMM, Nostro et al. (2016) não identificaram valores frente as duas bactérias, sendo a concentração máxima testada de 5000 µg/mL (5

mg/mL). Já o presente estudo verificou CMM para *P. aeruginosa* com 50 mg do extrato. Para *S. aureus* não foram encontrados valores de CMM. É importante ressaltar que as cepas de referência (ATCC) utilizadas divergem entre os estudos, portanto as características moleculares e padrões de referência são diferentes. Outro ponto a se ressaltar está no tipo de extrato utilizado, o presente estudo utilizou extratos glicólicos de *J. regia* enquanto Nostro et al. (2016) utilizaram extratos metanólicos de *J. regia*. Como já descrito em literatura o método de extração e o tipo de eluente utilizado no extrato interferem diretamente nas moléculas que o compõe (Fernández-Agullóa et al., 2013).

Diferentemente deste estudo, Fernández-Agullóa et al. (2013) utilizaram a casca da árvore de *J. regia* para produzir um extrato aquoso. Com a técnica de disco difusão em ágar, a CIM foi obtida com 50 mg/mL, para *S. aureus* promovendo um halo de inibição com 3 a 5 mm. Já para *P. aeruginosa* não foi determinada uma concentração capaz de inibir seu crescimento. O resultado de CIM para *S. aureus* é semelhante ao encontrado no presente trabalho, a divergência de resultados foi para *P. aeruginosa*, uma vez que neste estudo foi encontrada CIM com 25 mg do extrato glicólico.

Farooqui et al. (2015) utilizaram cepas clínicas multirresistentes para testar o extrato aquoso e etanólico da casca da árvore de *J. Regia*. Os teste foram realizados com treze espécies bacterianas: *Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis*, *Micrococcus*, *Escherichia coli*, *Salmonella entérica*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Streptococcus pyogenes*, *Streptococcus pneumonie*, *Shigella species*, *Enterobacter cloacae*, *Pasteurella multocida*, *Helicobacter pylori* e *Campylobacter jejuni*. Para *P. aeruginosa* a CIM e CMM com os dois tipos de extrato não foram determinados até a concentração de 5mg/mL. Apesar dos diferentes tipos de extrato, os valores obtidos indicam similaridade com o presente estudo, pois foi necessário uma concentração mais alta para inibição dessa espécie.

Duas cepas de *S. aureus*, com diferentes padrões de resistência a antimicrobianos também foram testados, os resultados indicaram para a cepa resistente a meticilina (MRSA) CIM com 0,31 mg/ml e CMM com 0,6 mg/mL. Já a cepa Pan susceptível obteve CIM com 1,25 mg/mL e CMM com 2,5 mg/mL com o extrato aquoso. Neste estudo a cepa ATCC de *S. aureus* demonstrou-se CIM com 50 mg do extrato glicólico de *J. regia*, porém não foram obtidos valores de CMM.

O extrato metanólico resultou em valores diferentes; a cepa MRSA obteve CIM com 0,31 mg/mL e CMM com 1,06 mg/mL e a cepa Pan susceptível obteve CIM com 0,53 mg/mL e CMM com 1,06 mg/mL. Valores também divergentes do presente estudo, apesar da comparação de um resultado ser semelhante a este trabalho as diferenças se destacam, fortalecendo mais a hipótese da relação entre os compostos e o método de extração. Vale ressaltar também que os testes empregados para determinar os valores de CIM e CMM também são diferentes já que Farooqui e colaboradores utilizaram o teste de disco-difusão em ágar e neste estudo foi aplicado o teste de microdiluição em caldo.

Com base na constituição molecular de *J. regia* alguns efeitos biológicos podem ser explicados. Rauha et al. (2000) verificaram os efeitos antimicrobianos de flavonóides e polifenóis derivados de diversos extratos naturais. Os compostos polifenólicos e flavonóides demonstraram ação antifúngica com a inibição do crescimento de *C. albicans*. Isso pode explicar a atividade antifúngica demonstrada pelo extrato de *J. regia* no presente estudo, já que *Juglans regia* possui uma grande diversidade de polifenóis e flavonóides (C-glicosídeo, quercitina) (Farooqui et al., 2015; Panth et al., 2016). e quando aplicado o extrato sobre cepas de *Candida* spp. (*C. albicans*, *C. glabrata*, *C. tropicalis* e *C. guilhermondii*) os mesmos sofreram grandes danos em sua estrutura celular, indicado pelo teste de MTT.

Na busca por elucidar melhor esse mecanismo de ação Sánchez e colaboradores (2010) creditaram a alguns tipos de flavonoides a capacidade de penetrar a membrana celular de micro-organismos, provocando danos a membrana celular além de alteração no pH interno e bloqueio da síntese de ATP (Adenosina trifosfato) no micro-organismo, comprovando mais uma vez os efeitos antimicrobianos encontrados no presente estudo.

As quinonas ou naftoquinonas presentes na constituição de *J. regia* também tem ganho destaque por seus efeitos biológicos, em destaque a molécula juglona (juglone).

Wang et al. (2016) utilizando a cepa ATCC 6538 de *S. aureus* verificou que proteínas estruturais da bactéria sofreram uma queda em sua expressão após aplicação da molécula juglona isolada. Dentre as proteínas que obtiveram sua expressão reduzida estão as ribossômicas (133, 114 e 136) interligadas ao processo de transcrição; proteínas de reparo celular; proteínas envolvidas na síntese de serinas; proteínas envolvidas na glicosilação (N-acetiltransferases e N-acetilmurâmico-alanina-amidase). Em conclusão, os autores creditaram a juglona a capacidade de interferir no processo de oxidação da célula do micro-organismo, diminuindo suas enzimas de combate a oxirredução, além de afetar as proteínas de membrana e parede celular.

Apesar dos benefícios descritos por Wang et al. (2016), o presente estudo não identificou um grande potencial do extrato de *J. regia* sobre a cepa ATCC 6538 de *S. aureus*, obtendo apenas CIM com 100 mg/mL do extrato glicólico. Porém é importante destacar que Wang e colaboradores utilizaram a molécula de juglona isolada, podendo usufruir de uma concentração muito mais elevada do que a encontrada no extrato.

Apesar do importante efeito antimicrobiano demonstrado por *Juglans regia*, poucos são os trabalhos que avaliam a toxicidade do extrato aplicado em células normais. Muitas pesquisas relacionam a capacidade de componentes do

extrato em combater células cancerígenas, alguns já relacionam sua aplicação direta em pacientes, não resultando em relatos de toxicidade ou efeitos nocivos.

No presente estudo, a avaliação de *J. regia* sobre fibroblastos gengivais humanos resultou em alguns valores tóxicos, segundo a nova diretriz de toxicidade. O teste de MTT indicou toxicidade celular apenas com a concentração de 200 mg do extrato, com a viabilidade de FMM 1 em 59,1%.

Já os testes de Vermelho neutro (VN) e Cristal violeta (CV) demonstraram resultados curiosos, a viabilidade dos fibroblastos gengivais foi mais alterada a medida que a concentração do extrato diminuía. Os testes indicaram uma menor atividade lisossomal da célula e também uma menor concentração de ácidos desoxirribonucléicos após aplicação do extrato. Considerando estes testes a concentração de 200 mg do extrato de *J. regia* não obteve citotoxicidade com média de 70% de viabilidade celular, já as concentrações de 100 mg e 50 mg do extrato foi capaz de reduzir a viabilidade de FMM-1 abaixo do limiar de toxicidade.

Em contrapartida aos resultados obtidos por este estudo, com redução da viabilidade de FMM -1 em 55,1% com 200 mg do extrato glicólico, Rywaniak et al. (2015) avaliaram o potencial antiplaquetário do extrato polifenólico de *J. regia*. O extrato não demonstrou ação tóxica sobre células sanguíneas.

O extrato também não demonstrou toxicidade ao ser aplicado diretamente em humanos, onde Hosseine et al. (2014) avaliaram sua aplicação em pacientes diabéticos, em esquema duplo cego. Os pesquisadores concluíram que a administração do extrato (100 mg/kg do paciente), duas vezes ao dia, por 3 meses, resultou em queda das taxas da glicemia de jejum (Gli), reduziu os valores de hemoglobina glicada (HbA1c), além de reduzir os valores de colesterol e triacilglicerol sem causar efeitos colaterais nos pacientes da pesquisa. Os resultados obtidos por Hosseine et al., (2014) embasam mais uma

vez a não toxicidade dos compostos de *J. regia*, contrapondo os resultados do presente estudo.

Outro campo de avaliação de toxicidade do extrato de *J. regia* e seus componentes envolvem sua aplicação em células neoplásicas. Zhang et al. (2015) avaliaram os efeitos da juglona sobre 8 diferentes tipos de linhagens de células tumorais, células da próstata (Colo-205, HCT-116, PC-3 e DU-145), células da mama (T47D), células tumorais da pele (A-431) e por fim células tumorais do pulmão (NCI-H322 e A549). A molécula demonstrou efeito antitumoral, sendo citotóxica a todas as linhagens testadas, porém demonstrou maior ação em células tumorais do pulmão. Apesar da diferença entre as linhagens e tipos de célula, o conceito de toxicidade se assemelha ao presente estudo, que apresentou redução de 40,4% de FMM-1 (fibroblastos gengivais humanos) com 200 mg do extrato de *J. regia*.

Apesar das células cancerígenas demonstrarem muitas diferenças em relação a alterações em proteínas e receptores, a toxicidade que o extrato demonstra se assemelha a alguns valores encontrados pelo presente estudo. Entretanto, um estudo feito por Ji et al. (2016) elucidou um pouco mais a atuação dos componentes de *J. regia* sobre células. As moléculas de *J. regia* são capazes de produzir maiores danos às células neoplásicas devido a sua ação sobre genes relacionados a neoplasias, diminuindo a expressão de genes como o BCl-2, além de causar o aumento significativo de oxigênios reativos intracelular, e ativação da caspase 3 (apoptose celular).

Os mecanismos que envolvem a toxicidade dos compostos de *J. regia* ainda não são bem esclarecidos, sendo necessário mais estudos que avaliem sua ação, porém são observados na literatura estudos que aplicam diretamente o extrato de *J. regia* em humanos, tornando sua toxicidade algo muito discutível. O presente estudo indicou que a toxicidade do extrato de *J. regia*, aplicados na linhagem FMM-1, variou conforme a concentração do mesmo. O presente

estudo destaca também que o extrato de *J. regia* demonstrou importante ação antifúngica.

6 CONCLUSÃO

Diante dos resultados obtidos pode-se concluir que:

O extrato glicólico de *P. paniculata* possui atividade antifúngica aplicado em biofilmes monotípicos e suspensões planctônicas de *C. albicans*, *C. glabrata*, *C. guilhermondii*, *C. krusei*, *C. tropicalis* e *C. dubliniensis*. As culturas planctônicas obtiveram CMM, em média, com 100 mg/mL do extrato. Já os testes de biomassa (CV) e atividade metabólica (MTT) indicaram que a maior concentração do extrato (200 mg/mL) foi responsável por causar as maiores reduções dos biofilmes, com redução média de 41,9%, após 5 min de aplicação.

Foi verificada atividade antibacteriana do extrato de *P. paniculata* sobre biofilmes monotípicos e suspensões planctônicas de *S. mutans* e *P. aeruginosa*. O teste de microdiluição em caldo apontou CMM de 50 mg/mL para *P. aeruginosa* e 100 mg/mL para *S. mutans*. Já os biofilmes foram reduzidos em média 34,2%.

O extrato de *P. paniculata* causou a redução da viabilidade celular, da linhagem de fibroblastos gengivais humanos (FMM-1), sendo a maior concentração do extrato (200 mg/mL) responsável pelo maior valor de toxicidade, reduzindo a viabilidade das células a 55,2%.

O extrato glicólico de *J. regia* demonstrou atividade antifúngica, aplicado em biofilmes monotípicos e suspensões planctônicas de *C. albicans*, *C. glabrata*, *C. guilhermondii*, *C. krusei*, *C. tropicalis* e *C. dubliniensis*. Sendo que a morte da suspensão planctônica foi obtida, em média, com a concentração de 25 mg/mL. Já os testes em biofilme indicaram redução média de 33,3%, com 200 mg/mL do extrato.

O extrato de *J. regia* demonstrou atividade antibacteriana em biofilmes monotípicos e suspensões planctônicas de *P. aeruginosa*. Os testes indicaram

valor de CMM com 50 mg/mL do extrato e redução do biofilme em 23,3%, após aplicação de 200 mg/mL do extrato.

O extrato de *J. regia* apresentou toxicidade celular aplicado em fibroblastos gengivais (FMM-1), com redução da viabilidade celular a 61,2%, após a aplicação de 50 mg/mL do extrato.

REFERÊNCIAS*

Aamodt H, Mohn SC, Maselle S, Manji KP, Willems R, Jureen R, et al. Genetic relatedness and risk factor analysis of ampicillin-resistant and high-level gentamicin-resistant enterococci causing bloodstream infections in Tanzanian children. *BMC Infect Dis.* 2015;15:107. doi: 10.1186/s12879-015-0845-8.

Abdelkareem MZ, Sayed M, Hassuna NA, Mahmoud MS, Abdelwahab SF. Multi-drug-resistant *Enterococcus faecalis* among Egyptian patients with urinary tract infection. *J Chemother.* 2016 Jun 28:1-9. doi: 10.1080/1120009X.2016.1182358.

Almeida IF, Fernandes E, Lima JLFC, Costa PC, Bahia MF. Walnut (*Juglans regia*) leaf extracts are strong scavengers of pro-oxidant reactive species. *Food Chem* 2008;106(3):1014–20. doi:10.1016/j.foodchem.2007.07.017.

Altemimi A, Watson DG, Kinsel M, Lightfoot DA. Simultaneous extraction, optimization, and analysis of flavonoids and polyphenols from peach and pumpkin extracts using a TLC-densitometric method. *Chem Cent J.* 2015;9:39. doi:10.1186/s13065-015-0113-4.

Araújo D, Henriques M, Silva S. Portrait of *Candida* Species Biofilm Regulatory Network Genes. *Trends Microbiol.* 2017;25(1):62-75. doi: 10.1016/j.tim.2016.09.004.

Baker TM, Satlin MJ. The growing threat of multidrug-resistant Gram-negative infections in patients with hematologic malignancies. *Leuk Lymphoma.* 2016. 57(10):2245-58. doi: 10.1080/10428194.2016.1193859.

Benzie IFF, Wachtel-Galor S. Herbal medicine: biomolecular and clinical aspects. 2. ed. Boca Raton (FL): CRC Press; 2011.

Castanheira M, Messer SA, Rhomberg PR, Pfaller MA. Antifungal susceptibility patterns of a global collection of fungal isolates:

* Baseado em: International Committee of Medical Journal Editors Uniform Requirements for Manuscripts Submitted to Biomedical journals: Sample References [Internet]. Bethesda: US NLM; c2003 [atualizado 04 nov 2015; acesso em 25 jan 2016]. U.S. National Library of Medicine; [about 6 p.]. Disponível em: http://www.nlm.nih.gov/bsd/uniform_requirements.html

results of the SENTRY Antifungal Surveillance Program (2013). *Diagn Microbiol Infect Dis*. 2016;85(2):200-4. doi: 10.1016/j.diagmicrobio.2016.02.009.

Coêlho ML, Ferreira JH, de Siqueira Júnior JP, Kaatz GW, Barreto HM, de Carvalho Melo Cavalcante AA. Inhibition of the NorA multi-drug transporter by oxygenated monoterpenes. *Microb Pathog*. 2016;99:173-7. doi: 10.1016/j.micpath.2016.08.026.

Costa AC, Pereira CA, Freire F, Junqueira JC, Jorge AO. Methods for obtaining reliable and reproducible results in studies of *Candida* biofilms formed in vitro. *Mycoses*. 2013;56(6):614-22. doi: 10.1111/myc.12092.

Costa CA, Tanimoto A, Quaglio AE, Almeida LD Jr, Severi JA, Di Stasi LC. Anti-inflammatory effects of Brazilian ginseng (*Pfaffia paniculata*) on TNBS-induced intestinal inflammation: Experimental evidence. *Int Immunopharmacol*. 2015;28(1):459-69. doi: 10.1016/j.intimp.2015.07.002.

Eberlin S, Del Carmen Velazquez Pereda M, de Campos Dieamant G, Nogueira C, Werka RM, de Souza Queiroz ML. Effects of a Brazilian herbal compound as a cosmetic eyecare for periorbital hyperchromia ("dark circles"). *J Cosmet Dermatol*. 2009;8(2):127-35. doi: 10.1111/j.1473-2165.2009.00438.x.

Espinel-Ingroff A, Pfaller MA, Bustamante B, Canton E, Fothergill A, Fuller J, et al. Multilaboratory study of epidemiological cutoff values for detection of resistance in eight *Candida* species to fluconazole, posaconazole, and voriconazole. *Antimicrob Agents Chemother*. 2014;58(4):2006-12. doi: 10.1128/AAC.02615-13.

Falkinham JO. Common features of opportunistic premise plumbing pathogens. *Int J Environ Res Public Health*. 2015;12(5):4533-45. doi: 10.3390/ijerph120504533.

Farooqui A, Khan A, Borghetto I, Kazmi SU, Rubino S, Paglietti B. Synergistic Antimicrobial Activity of *Camellia sinensis* and *Juglans regia* against Multidrug-Resistant Bacteria. *PLoS One*. 2015;10 (2):e0118431. doi:10.1371/journal.pone.0118431.

Felipe DF, Brambilla LZS, Porto C, Pilau EJ, Cortez DAG. Phytochemical Analysis of *Pfaffia glomerata* Inflorescences by LC-ESI-MS/M. *Molecules* 2014;19(10):15720-734. doi:10.3390/molecules191015720.

- Fernández-Agulló A, Pereira E, Freire MS, Valentão P, Andradec PB, González-Álvarez J. Influence of solvent on the antioxidant and antimicrobial properties of walnut (*Juglans regia* L.) green husk extracts. *Ind Crops Prod* 2013;42,126–32. doi: 10.1016/j.indcrop.2012.05.021.
- Freitas CS, Baggio CH, Silva-Santos JE, Rieck L, Santos CAM, Corrêa CJ, et al. Involvement of nitric oxide in the gastroprotective effects of an aqueous extract of *Pfaffia glomerata* (Spreng) Pedersen, Amaranthaceae, in rats. *Life Sci*. 2004;74(9):1167–79. doi: 10.1016/j.lfs.2003.08.003.
- Hosseini S, Jamshidi L, Mehrzadi S, Mohammad K, Najmizadeh AR, Alimoradi H, et al. Effects of *Juglans regia* L. leaf extract on hyperglycemia and lipid profiles in type two diabetic patients: A randomized double-blind, placebo-controlled clinical trial. *J Ethnopharmacol*. 2014;152(3):451–6. doi: 10.1016/j.jep.2014.01.012.
- Hu J, Ma XX, Tian Y, Pang L, Cui LZ, Shang H. Reduced vancomycin susceptibility found in methicillin-resistant and methicillin-sensitive *Staphylococcus aureus* clinical isolates in Northeast China. *PLoS One*. 2013;8(9):e73300. doi: 10.1371/journal.pone.0073300.
- Jafari E, Andalib S, Abed A, Rafieian-Kopaei M, Vaseghi G. Neuroprotective, antimicrobial, antioxidant, chemotherapeutic, and antidiabetic properties of *Salvia Reuterana*: A mini review. *Avicenna J Phytomed*. 2015;5(1):10-6.
- Jenks DB, Ehrlich Y, Spolnik K, Gregory RL, Yassen GH. Residual antibiofilm effects of various concentrations of double antibiotic paste used during regenerative endodontics after different application times. *Arch Oral Biol*. 2016 Jun 7;70:88-93. doi: 10.1016/j.archoralbio.2016.06.006.
- Ji YB, Xin GS, Qu ZY, Zou X, Yu M. Mechanism of juglone-induced apoptosis of MCF-7 cells by the mitochondrial pathway. *Genet Mol Res*. 2016 Jul 25;15(3). doi: 10.4238/gmr.15038785.
- Joshan DS, Singhb SK. Investigational study of *Juglans regia* extract and quercetin against photoaging. *Biomed Aging Pathol*. 2013;3(4):193–200. doi: 10.1016/j.biomag.2013.08.005.
- Kent RM, Fitzgerald GF, Hill C, Stanton C, Ross RP. Novel approaches to improve the intrinsic microbiological safety of powdered infant milk formula. *Nutrients*. 2015 Feb 12;7(2):1217-44. doi: 10.3390/nu7021217.

- Leal PF, Kfoury MB, Alexandre FC, Fagundes FHR, Prado JM, Toyama MH, et al. Brazilian Ginseng extraction via LPSE and SFE: Global yields, extraction kinetics, chemical composition and antioxidant activity. *J Supercrit Fluids*. 2010;54(1):38–45. doi: 10.1016/j.supflu.2010.03.007.
- Li J, Jadhav An, Khan IA. Triterpenoids from Brazilian Ginseng, *Pfaffia paniculata*. *Planta Med*. 2010;76(6):635-9 doi: 10.1055/s-0029-1240631.
- Lima SMF, Sousa MGAC, Freire MS, Almeida JA, Cantuaria APC, Silva TAM, et al. Immune Response Profile against Persistent Endodontic Pathogens *Candida albicans* and *Enterococcus faecalis* In Vitro. *J. Endod*. 2015;41(7):1061-5. doi: 10.1016/j.joen.2015.02.016.
- Liu B , Chen F, Bi C, Wang L , Zhong X , Cai H, et al. Quercitrin, an Inhibitor of Sortase A, Interferes with the Adhesion of *Staphylococcus aureus*. *Molecules* 2015;20(4):6533-43. doi:10.3390/molecules20046533.
- Madeira FPM, Coutinho V, Montanher ABP, Caroi MSB, Brighente IMC, Pizzolatti MG, et al. Flavonoids and triterpenes from *Baccharis pseudotenuifolia* – Bioactivity on *Artemia salina*. *Quím Nova*. 2003;26(3):309-11. doi: 10.1590/S0100-40422003000300004.
- Marchioretto, MS, Miotto STS, Siqueira JC. Padrões de distribuição geográfica dos táxons brasileiros de *Hebanthe Mart.* (Amaranthaceae). *Pesq Bot*. 2008;59:159 –70.
- Marchioretto MS, Miotto STS, Siqueira JC. O gênero *Pfaffia Mart.* (Amaranthaceae) no Brasil. *Hoehnea* 2010;37(3):461-511. doi: 10.1590/S2236-89062010000300004.
- Marcos-Zambrano LJ, Escribano P, Bouza E, Guine J. Production of biofilm by *Candida* and non-*Candida* spp. isolates causing fungemia: Comparison of biomass production and metabolic activity and development of cut-off points. *Int J Med Microbiol*. 2014;304(8):1192-8. doi: 10.1016/j.ijmm.2014.08.012.
- Mikalsen T, Pedersen T, Willems R, Coque TM, Werner G, Sadowy E, et al. Investigating the mobilome in clinically important lineages of *Enterococcus faecium* and *Enterococcus faecalis*. *BMC Genomics*. 2015;16:282. doi: 10.1186/s12864-015-1407-6.
- Morrissey JP, Osbourn AE. Fungal Resistance to Plant Antibiotics as a Mechanism of Pathogenesis. *Microbiol Mol Biol Rev*. 1999;63(3):708–24.

Mozar A, Charlot K, Sandor B, Rabai M, Lemonne N, Billaud M, et al. *Pfaffia paniculata* extract improves red blood cell deformability in sickle cell patients. *Clin Hemorheol Microcirc.* 2015;62(4):327-33. doi: 10.3233/CH-151972.

Nilson B., Olaison L, Rasmussen M. Clinical presentation of infective endocarditis caused by different groups of non-beta haemolytic streptococci. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.* 2016;35(2):215-8. doi: 10.1007/s10096-015-2532-5.

Nishimoto N, Nakai S, Takagi N, Hayashi S, Takemoto T, Odashima S, et al. Pfaffosides and nortriterpenoid saponins from *Pfaffia paniculata*. *Phytochemistry.* 1984;23(1) 139-42. doi: 10.1016/0031-9422(84)83094-0.

Nostro A, Guerrini A, Marino A, Tacchini M, Di Giulio M, Grandini A, et al. In vitro activity of plant extracts against biofilm-producing food-related bacteria. *Int J Food Microbiol.* 2016;238:33-39. doi: 10.1016/j.ijfoodmicro.2016.08.024.

Panth N, Paudel KR, Karki R. Phytochemical profile and biological activity of *Juglans regia*. *J Integr Med.* 2016;14(5):359-73. doi: 10.1016/S2095-4964(16)60274-1.

Pereira CAP, Marra AR, Camargo LFA, Pignatari ACC, Sukiennik T, Behar PRP, et al. Nosocomial Bloodstream Infections in Brazilian Pediatric Patients: Microbiology, Epidemiology, and Clinical Features. *PLoS One.* 2013;8(7):e68144. doi: 10.1371/journal.pone.0068144

Pham QD, Topgaard D, Sparr E. Cyclic and Linear Monoterpenes in Phospholipid Membranes: Phase Behavior, Bilayer Structure, and Molecular Dynamics *Langmuir.* 2015;31(40):11067-77. doi: 10.1021/acs.langmuir.5b00856.

Porcheron G, Dozois CM. Interplay between iron homeostasis and virulence: Fur and RyhB as major regulators of bacterial pathogenicity. *Vet Microbiol.* 2015;179(1-2):2-14. doi: 10.1016/j.vetmic.2015.03.024.

Rates SMK, Gosmann G. Gênero *Pfaffia*: aspectos químicos, farmacológicos e implicações para o seu emprego terapêutico. *Rev Bras Farmacognosia* 2002;12(2):85-93.

Rather MA, Dar BA, Dar MY, Wani BA, Shah WA, Bhat BA, et al. Chemical composition, antioxidant and antibacterial activities of the leaf essential oil of *Juglans regia* L. and its constituents. *Phytomedicine.* 2012;19(13):1185-90. doi: 10.1016/j.phymed.2012.07.018.

Rauhaa JP, Remesa S, Heinonenb M, Hopiab A, Kähkönenb M, Kujalac T, et al. Antimicrobial effects of Finnish plant extracts containing flavonoids and other phenolic compounds. *Int J Food Microbiol.* 2000;56(1):3-12. doi: 10.1016/S0168-1605(00)00218-X.

Rodrigues MVN, Souza KP, Rehdera VLG, Vilela GS, Júniora IM, Glyn Mara, et al. Development of an analytical method for the quantification of pfaffic acid in Brazilian ginseng (*Hebanthe eriantha*). *J Pharm Biomed Anal.* 2013;77:76–82. doi: 10.1016/j.jpba.2013.01.010.

Rodríguez-Leguizamón G, Fiori A, Lagrou K, Gaona MA, Ibáñez M, Patarroyo MA, et al. New echinocandin susceptibility patterns for nosocomial *Candida albicans* in Bogotá, Colombia, in ten tertiary care centres: an observational study. *BMC Infect Dis;* 2015;15:108. doi: 10.1186/s12879-015-0840-0

Ruberto G, Baratta MT. Antioxidant activity of selected essential oil components in two lipid model systems. *Food Chemistry.* 2000;69(2)167–74. doi: 10.1016/S0308-8146(99)00247-2.

Rywaniak J, Luzak B, Podsedek A, Dudzinska D, Rozalski M, Watala C. Comparison of cytotoxic and anti-platelet activities of polyphenolic extracts from *Arnica montana* flowers and *Juglans regia* husks. *Platelets.* 2015;26(2):168-76. doi: 10.3109/09537104.2014.894970.

Sánchez E, García S e Heredia N. Extracts of Edible and Medicinal Plants Damage Membranes of *Vibrio cholera*. *Appl. Environ. Microbiol.* 2010; 76(20) 6888-94. doi: 10.1128/AEM.03052-09.

Sargin SA, Akçicek E, Selvi S. An ethnobotanical study of medicinal plants used by the local people of Alaşehir (Manisa) in Turkey. *J Ethnopharmacol.* 2013;50:860–74. doi: 10.1016/j.jep.2013.09.040.

Savić VL, Nikolić VD, Arsić IA, Stanojević LP, Najman SJ, Stojanović S. et al. Comparative Study of the Biological Activity of Allantoin and Aqueous Extract of the Comfrey Root. *Phytother Res.* 2015;29(8):1117-22. doi: 10.1002/ptr.5356.

Shiobara Y, Inoue SS, Kato K, Nishiguchi Y, Oishi Y, Nishimoto N, et al. A nortriterpenoid, triterpenoids and ecdystereoids from *Pfaffia glomerata*. *Phytochemistry* 1993;32(6):1527–30. doi: 10.1016/0031-9422(93)85172-N.

Silva LN, Trentin Dda S, Zimmer KR, Treter J, Brandelli CL, Frasson AP, et al. Anti-infective effects of Brazilian Caatinga plants against pathogenic bacterial biofilm formation. *Pharm Biol.* 2015;53(3):464-8. doi: 10.3109/13880209.2014.922587.

Süzük S, Kaşkatepe B, Çetin M. Antimicrobial susceptibility against penicillin, ampicillin and vancomycin of viridans group *Streptococcus* in oral microbiota of patients at risk of infective endocarditis. *Infez Med.* 2016 Sep 1;24(3):190-3.

Takemoto T, Nishimoto N, Nakai S, Takagi N, Hayashi S, Odashima S, et al. Pfaffic acid, a novel nortriterpene from *Pfaffia paniculata* Kuntze. *Tetrahedron Lett.* 1983;24(10):1057-60. doi: 10.1016/S0040-4039(00)81603-2.

Vermaa RS, Padaliaa RC, Chauhana A, Thulb ST. Phytochemical analysis of the leaf volatile oil of walnut tree (*Juglans regia* L.) from western Himalaya. *Ind Crops Prod.* 2013;42:195– 201. doi: 10.1016/j.indcrop.2012.05.032

Viganor L, Galdino AC, Nunes AP, Santos KR, Branquinha MH, Devereux M, et al. Anti-*Pseudomonas aeruginosa* activity of 1,10-phenanthroline-based drugs against both planktonic- and biofilm-growing cells. *J Antimicrob Chemother.* 2016 Jan;71(1):128-34. doi: 10.1093/jac/dkv292.

Wang J, Wang Z, Wu R, Jiang D, Bai B, Tan D, et al. Proteomic Analysis of the Antibacterial Mechanism of Action of Juglone against *Staphylococcus aureus*. *Nat Prod Commun.* 2016;11(6):825-7.

Yang SZ, Cao SNB. *The divine farmer's materia medica: a translation of the Shen Nong Ben Cao.* Costa Mesa, CA: Blue Poppy Press;1998.

Zakavi F, Hagh LG, Daraeighadikolaei A, Sheikh AF, Daraeighadikolaei A, Shooshtari ZL. Antibacterial Effect of *Juglans Regia* Bark against Oral Pathologic Bacteria. *Int Dent.* 2013;2013:854765. doi: 10.1155/2013/854765.

Zhang XB, Zou CL, Duan YX, Wu F, Li G. Activity guided isolation and modification of juglone from *Juglans regia* as potent cytotoxic agent against lung cancer cell lines. *BMC Complement Altern Med.* 2015;15:396. doi: 10.1186/s12906-015-0920-0.

ANEXO A — Laudo Técnico do extrato glicólico de *Pfaffia paniculata* disponível em: http://www.mapric.com.br/anexos/Boletim830_11082014-11h36.pdf



EXTRATO GLICÓLICO DE PFÁFFIA (HG)

Nome Científico: *Pfaffia paniculata* Kuntze / Amaranthaceae

INCI: Pfaffia Paniculata Extract

Nº CAS: 57-55-6; 64-17-5; 7732-18-5; 26172-55-4/2682-20-4; 99-76-3

Parte Utilizada: Raiz

Fórmula Molecular: N.A

Peso Molecular: N.A

PRINCÍPIOS ATIVOS

Saponinas; oligoelementos; ácido pfáfico; fásfosídeos; alantoína; esteróides; compostos triterpênicos; fitosteróis; aminoácidos; mucilagem; sais minerais (P, Ca e K); alantoína; vitaminas A, B, D, E e F.

PROPRIEDADES E EMPREGOS TERAPÊUTICOS:

O Extrato Glicólico de *Pfaffia* tem ação: tonificante; cicatrizante; antiinflamatória; refrescante; estimulante celular; restauradora de tecidos; hidratante; nutritiva.

Poderá ser incorporado em cremes, loções cremosas, hidroalcoólicas ou tônicas, em shampoos, condicionadores, géis, cremes para banho, máscaras faciais, sabonetes, produtos pós-sol, pós-barba e outros produtos cosméticos. Indicado somente para uso externo em concentração de até 10%.

Atenção: O Extrato Glicólico de *Pfaffia* deve ser adicionado no final da preparação cosmética, com o produto em temperatura abaixo de 45° C.

ESTOCAGEM E VALIDADE

Deve ser estocado hermeticamente fechado, ao abrigo da luz solar direta e do calor. Prazo de validade: 36 meses a partir da data de fabricação.

Obs.:

- Poderá ocorrer formação de precipitado e/ou turbidez durante a estocagem, sem alterar as propriedades.
- Alterações da cor são esperadas por modificações dos compostos coloridos das plantas.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Alonso, J.R.; Tratado de Fitomedicina–Bases Clínicas e Farmacológicas. ISIS Ediciones SRL, 1998. Balmé, F.; Plantas Mediciniais. Ed. Helmus, 1994.

Coimbra, R.; Manual de Fitoterapia. Ed. CEJUP, 1994.

Cruz, G.L. Dicionário das Plantas Úteis do Brasil, 3º edição, 1985. Moreira, F.; As Plantas que Curam. Ed. Helmus, 1985.

Av. Gentil de Moura, 194 CEP 04278 080 Ipiranga São Paulo SP
Tel/Fax 55 (11) 5061.5282
mapric@mapric.com.br www.mapric.com.br

ANEXO B — Laudo Técnico do extrato glicólico de *Juglans regia L*
disponível em: http://www.mapric.com.br/anexos/Boletim827_11082014-11h19.pdf



EXTRATO GLICÓLICO DE NOGUEIRA

Nome Científico: *Juglans regia L.* / Juglandaceae

INCI: Juglans Regia Leaf Extract

Nº CAS: 84012-43-1

Parte Utilizada: Folha

Fórmula Molecular: N.A

Peso Molecular: N.A

PRINCÍPIOS ATIVOS

A folha da noqueira contém: tanino (3 a 4%), flavonóides (quercitina), óleos essencial, naftoquinonas (juglona, alfa e beta-hidroxiquinona, entre outras).

PROPRIEDADES E EMPREGOS TERAPÊUTICOS

O Extrato Glicólico de Nogueira HG tem ação antifúngica, levemente anti-séptica, vesicatória e queratinizante (causa coloração à pele), adstringente e cicatrizante. Indicado como auxiliar para tratamento da caspa e seborréia, antiqueda de cabelo, como tintura para escurecer cabelos brancos e como auxiliar na foto-proteção. Usado também no tratamento das afecções cutâneas como eczemas, acne, dermatites e danos causados pelo frio. Poderá ser utilizado em: cremes, loções cremosas, hidroalcoólicas ou tônicas, em shampoos, géis, máscaras faciais, produtos pós-sol e outros produtos cosméticos. Indicado somente para uso externo em concentrações de até 10%.

Atenção: O Extrato Glicólico de Nogueira HG deve ser adicionado no final da preparação cosmética, com o produto em temperatura abaixo de 45^o C.

ESTOCAGEM E VALIDADE

Deve ser estocado hermeticamente fechado, ao abrigo da luz solar direta e do calor. Prazo de validade: 36 meses a partir da data de fabricação.

Obs.:

- Poderá ocorrer formação de precipitado e/ou turbidez durante a estocagem, sem alterar as propriedades.
- Alterações da cor são esperadas por modificações dos compostos coloridos das plantas.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Alonso, J.R.; Tratado de Fitomedicina–Bases Clínicas e Farmacológicas. ISIS Ediciones SRL, 1998.

Balmé, F.; Plantas Mediciniais. Ed. Helmus, 1994.

Coimbra, R.; Manual de Fitoterapia. Ed. CEJUP, 1994.

Cruz, G.L. Dicionário das Plantas Úteis do Brasil, 3º edição, 1985.

Av. Dr Gentil de Moura, 194 CEP 04278 080 Ipiranga São Paulo SP
Tel/Fax 55 (11) 5061.5282
mapric@mapric.com.br www.mapric.com.br