



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

LUCAS DE PAULA RAMOS

**EXTRATOS GLICÓLICOS DE *Pfaffia paniculata* K E *Juglans regia* L.:
avaliação do potencial antimicrobiano, anti-inflamatório, citotóxico
e genotóxico**

LUCAS DE PAULA RAMOS

EXTRATOS GLICÓLICOS DE *Pfaffia paniculata* K E *Juglans regia* L.: avaliação do potencial antimicrobiano, anti-inflamatório, citotóxico e genotóxico

Tese 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 DOUTOR, pelo Programa de Pós-Graduação em BIOPATOLOGIA BUCAL.

Área: Microbiologia / Imunologia. Linha de pesquisa: Doenças infecciosas de interesse médico-odontológico

Orientadora: Profa. Assoc. Luciane Dias de Oliveira

São José dos Campos

2020

Instituto de Ciência e Tecnologia [internet]. Normalização de tese e dissertação [acesso em 2020]. 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).

Ramos, Lucas de Paula

Extratos glicólicos de *Pfaffia paniculata* K e *Juglans regia* L.: avaliação o potencial antimicrobiano, anti-inflamatório, citotóxico e genotóxico / Lucas de Paula Ramos. – São José dos Campos : [s.n.], 2020.
90 f. : il.

Tese (Doutorado em Biopatologia Bucal) – Pós-graduação em Biopatologia Bucal – Universidade Estadual Paulista (Unesp), Instituto de Ciência e Tecnologia, São José dos Campos, 2020.

Orientadora: Luciane Dias de Oliveira.

1. Antibacterianos. 2. Anti-inflamatório. 3. Fitoterapia. 4. Resistência microbiana a medicamentos. 5. *Juglans regia*. I. Oliveira, Luciane Dias de , 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

Prof. Assoc. Luciane Dias de Oliveira (Orientador)

Universidade Estadual paulista (Unesp)

Instituto de Ciência e Tecnologia

Campus de São José dos Campos

Prof. Dr. João Manoel Theothonio dos Santos

IPEP - Instituto Policlin de Pensibo e Pesquisa

Campus de São José dos Campos

Profa. Dra. Cristina Pacheco Soares

Universidade do Vale do Paraíba (UNIVAP)

Faculdade de Ciências da Saúde

Campus de São José dos Campos

Profa. Assoc. Luana Marotta Reis de Vasconcellos

Universidade Estadual paulista (Unesp)

Instituto de Ciência e Tecnologia

Campus de São José dos Campos

Vivian Cristina Costa Castilho Hyodo

Universidade Paulista (UNIP)

Instituto de Ciências da Saúde

Campus de São José dos Campos

São José dos Campos, 13 de Março de 2020.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus por me guiar e proteger sempre em minhas escolhas.

À Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” - Unesp, na pessoa da diretora do Instituto de Ciência e Tecnologia de São José dos Campos, Profa Assoc. Rebeca di Nicoló e do vice-diretor Prof. Assoc. Cláudio Antonio Talge Carvalho.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pela concessão da Bolsa de Doutorado registrada sob número 88882.434287/2019-01.

À meus pais Helen Cristiane de Paula Ramos e Ivens de Souza Ramos por todo apoio, carinho, paciência, dedicação, durante este período. Agradeço por sempre estarem comigo, mesmo nos momentos o qual estava irritado ou preocupado com os prazos, ou mesmo quando estava decepcionado quando os experimentos não davam certo. Mãe obrigado por suas orações e seu colo, você é minha inspiração de garra e determinação.

À meus avós, Neyde David de Paula (In memorian) e Antônio de Paula (In memorian) por todo carinho e incentivo que sempre me deram para o atingir meus objetivos.

À meus tios, Edna de Paula Molle e Aparecido Molle, pelas orações, cuidado e carinho comigo.

*Às minhas irmãs de coração **Maria Aparecida Marras** e **Marcia Regina Marras**, obrigado por sempre me aconselharem, obrigado por mostrar que o amor é o melhor caminho a se seguir, por mais que isso seja difícil nos dias de hoje. “Neninha” obrigado por nossas conversas, por vezes tristes (bem poucas) mas na maioria das vezes sempre rindo do que já aprontamos, dos micos que já pagamos, obrigado por tornar tudo mais leve. “Ma” obrigado pelo seu carinho, pelas conversas, você é uma inspiração em minha vida, sempre determinada, batalhadora, me ensinando sempre que o medo só nos ajuda a ir além, a enfrentar tudo com fé e seguir em frente.*

*À minha orientadora e amiga **Luciane Dias de Oliveira**, profa. obrigado por todo carinho e dedicação que sempre tem comigo, pela paciência, pelo tempo investido na minha formação. Agradeço muito as vezes que foi a bancada comigo, que me ajudou a fazer os cálculos das reações, das correções de artigos, do apoio no dia a dia do laboratório, mesmo com milhões de coisas a fazer você sempre arruma um jeito. Agradeço por confiar na minha pessoa, no meu trabalho, você sabe profa. que houve-ram momentos ruins durante esse período, pensei em desistir desse caminho com as adversidades que surgiram mas olhando sua força e sua garra me mantive firme e cá estamos! Obrigado por tudo Lu !*

*À meu amigo **Leonardo Alberti Silva**, sou muito grato as surpresas da vida, e você foi uma delas, te conheci na correria entre o trabalho e a faculdade, em pouco tempo nos tornamos amigos, falando sobre músicas, filmes e as chatices do dia-a-dia, hoje conhecendo a pessoa que tu é, sua*

família, só posso agradecer por estar na minha vida e por me apoiar cara, do seu modo rabugento as vezes, mas tudo bem.

*À minha amiga **Tatiane Cristina Alberti Silva**, pelo carinho, preocupação, pelas conversas jogadas fora. “Tati” obrigado pelo apoio nos momentos de cansaço, pela companhia no cinema, as doideiras do Instagram, as risadas de bobeira, isso faz tudo ficar mais leve! Obrigado por poder conhecer sua família, seu mundo, vocês são incríveis!*

*À **Carlos Eduardo Rocha Santos**, Dr. Carlos agradeço muito por poder conhecer o senhor, por seu profissionalismo, seu cuidado com as pessoas, sou muito grato por tudo que me ensina, por sua atenção, seu cuidado, sua calma.*

*À minha amiga **Fernanda Malagutti Tomé**, a pessoa responsável por me apresentar o mundo da pesquisa e docência, “Fe” sem você eu certamente teria partido para outro caminho. Você me guiou para este mundo, me mostrou o lado bom e ruim desta profissão, me mostrou o cansaço do dia-a-dia, os egos que aprendemos a lidar e apesar das coisas ruins você me mostrou a importância que tem um professor, o quanto podemos influenciar uma população, seja na pesquisa, seja disseminando a informação. Você me mostrou o “mundo” o qual mais sou fascinado, a Imunologia, e hoje tenho ele tatuado na minha pele!*

*À meus amigos do laboratório **Pamela Beatriz Estevam do Rosário Santos, Fabíola Vieira, Thaís Cristina Pereira, Vanessa Mecatti, Sabrina Liberato e Renata Lorraine** Obrigado pela convivência diária, o apoio, as risadas bobas quando está todo mundo cansado, as piadas, os almoços, obrigado por tudo!*

À meus amigos Felipe Eduardo Oliveira e Jonatas Rafael Oliveira que me ensinaram boa parte do que sei sobre laboratório, obrigado pela atenção mesmo quando tinham muitos experimentos a fazer, obrigado pela dedicação e pela companhia diária.

*"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.....	11
ABSTRACT.....	13
1 INTRODUÇÃO.....	15
2 PROPOSIÇÃO.....	20
2.1 Objetivo geral.....	20
2.2 Objetivos específicos.....	20
3 MATERIAL E MÉTODOS.....	22
3.1 Avaliação da atividade antimicrobiana do extrato.....	22
3.1.1 Anaeróbios.....	22
3.1.1.1 Determinação da concentração inibitória mínima (CIM) e concentração microbicida Mínima (CMM) para os micro-organismos anaeróbios.....	23
3.1.1.2 Avaliação da atividade antimicrobiana do extrato sobre biofilmes monotípicos de bactérias anaeróbias.....	24
3.1.1.2.1 Aplicação dos tratamentos e contagem de UFC/mL	25
3.1.2 Aeróbios.....	27
3.1.2.1 Determinação da CIM e CMM sobre aeróbios multirresistentes...	29
3.1.2.2 Biofilmes Heterotípicos e Monotípicos de aeróbios.....	29
3.1.2.2.1 Aplicação dos tratamentos sobre biofilmes Heterotípicos e Monotípicos de aeróbios.....	30
3.1.2.2.2 Avaliação da Biomassa pelo teste do Cristal Violeta.....	31
3.1.2.2.3 Atividade metabólica dos micro-organismos pelo teste de MTT.....	31
3.2 Testes em Células.....	32
3.2.1 Cultivo, Manutenção e Contagem celular.....	33
3.2.2 Avaliação da citotoxicidade dos extratos.....	34
3.2.3 Avaliação da atividade anti-inflamatória dos extratos em macrófagos de camundongos (RAW 264-7).....	36
3.2.3.1 Quantificação de citocinas - Ensaio imunoenzimático ELISA.....	38

3.2.4 Avaliação da genotoxicidade dos extratos (teste de micronúcleos).....	38
3.3 Análise fitoquímica do extrato.....	39
3.3.1 HPLC.....	39
3.4 Avaliação da Atividade Supressora de Radicais Livres.....	40
3.5 Análise estatística.....	40
4 RESULTADOS.....	41
4.1 Avaliação da atividade antimicrobiana dos extratos de <i>P. paniculata</i> e <i>J. regia</i> sobre bactérias anaeróbias.....	41
4.1.1 Ação antimicrobiana dos extratos de <i>P. paniculata</i> e <i>J. regia</i> sobre culturas planctônicas de bactérias anaeróbias.....	41
4.1.2 Ação antibiofilme dos extratos de <i>P. paniculata</i> e <i>J. regia</i> sobre bactérias anaeróbias.....	42
4.2 Avaliação da Citotoxicidade dos extratos através do teste de MTT.....	57
4.2.1 Citotoxicidade sobre Macrófagos de camundongo (Raw 264-7).....	57
4.2.2 Citotoxicidade sobre queratinócitos humanos (HaCat).....	59
4.3 Ação anti-inflamatória dos extratos de <i>P. paniculata</i> e <i>J. regia</i> sobre macrófagos de camundongos (RAW 264-7).....	61
4.4 Genotoxicidade dos extratos.....	63
4.4.1 Avaliação da genotoxicidade do extrato de <i>P. paniculata</i> e <i>J. regia</i>	63
4.5 Atividade antioxidante dos extratos.....	67
4.6 Análise Fitoquímica dos extratos.....	68
5 DISCUSSÃO.....	70
6 CONCLUSÃO.....	81
REFERÊNCIAS.....	83
ANEXOS.....	89

Ramos LP. Extratos glicólicos de *Pfaffia paniculata* K e *Juglans regia* L.: avaliação do potencial antimicrobiano, anti-inflamatório, citotóxico e genotóxico [tese]. São José dos Campos (SP): Universidade Estadual Paulista (Unesp), Instituto de Ciência e Tecnologia ; 2020.

RESUMO

A resistência antimicrobiana atingiu proporções alarmantes em todo o mundo, sendo que na Europa mortes causadas por micro-organismos multirresistentes superaram os índices de mortalidade da AIDS, tuberculose e a gripe. Assim a fitoterapia desponta no combate a esta problemática, com as diversas atividades biológicas de plantas e seus derivados. Portanto os objetivos do presente estudo foram avaliar a ação antimicrobiana, anti-inflamatória, citotoxicidade, genotoxicidade e constituição fitoquímica dos extratos glicólicos de *P. paniculata* e *J. regia*. A ação sobre bactérias anaeróbias (*Porphyromonas gingivalis*, *P. endodontalis*, *Parvimonas micra* e *Fusobacterium nucleatum*) foi realizada por meio dos testes de microdiluição em caldo (Protocolo M11-A8 - CLSI) e sobre biofilmes monotípicos. Já a ação sobre aeróbios foi realizada sobre 3 cepas de *Klebsiella pneumoniae* multirresistente, com testes sobre culturas planctônicas (Protocolo M7-A9) e biofilmes; Foi realizada a verificação da atividade antimicrobiana sobre biofilmes heterotípicos de *Candida albicans* associada a *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus faecalis*, *Streptococcus mutans* ou *Pseudomonas aeruginosa*. A citotoxicidade e a genotoxicidade dos extratos foram avaliadas sobre macrófagos de camundongos (RAW 264.7) e queratinócitos humanos (HaCat) pelos testes de MTT e micronúcleos, respectivamente. O potencial anti-inflamatório foi verificado dosando os níveis de TNF- α , IL-10 e IL-1 β pelo teste de ELISA. Os dados obtiveram distribuição normal sendo a análise estatística realizada por ANOVA e Tukey ($p < 0,05\%$). Os extratos de *P. paniculata* e *J. regia* promoveram CMM de 50 mg/mL para as anaeróbias. Os biofilmes de *P. gingivalis* e *P. micra* foram eliminados com 100 e 200 mg/mL dos extratos (5 min) e com as concentrações de 50 e 100 mg/mL por 24 h; *F. nucleatum* e *P. endodontalis* obtiveram reduções variando de 80 a 90%. Os biofilmes heterotípicos de *C. albicans* e *S. mutans* obtiveram reduções de até 80% após contato por 5 min. com *J. regia* e 71% para *P. paniculata*. Os biofilmes multirresistentes de *K. pneumoniae* obtiveram reduções na atividade metabólica de até 67,9%. *P. paniculata* promoveu viabilidade celular variando de 61,1% a 133,8% sobre queratinócitos humanos após 24 h de contato com as concentrações de 12,5 a 0,39 mg/mL, enquanto *J. regia* obteve 43,9 a 128,4% de viabilidade. Os macrófagos de camundongo obtiveram viabilidade de 18,1 a 101,9% com *P. paniculata* e 35,4 a 60,6% para *J. regia*. *P. paniculata* promoveu a redução nos níveis da citocina pró-inflamatória IL-1 β e aumento nos níveis da citocina anti-inflamatória IL-10. Já *J. regia* promoveu a redução da citocina pró-inflamatória TNF- α . Ambos os extratos não promoveram genotoxicidade frente as linhagens celulares. A análise fitoquímica evidenciou a presença de benzofenonas e ácido cafeoilquínico nos extratos de *P. paniculata* e *J. regia*, respectivamente. Em conclusão, os extratos de *P. paniculata* e *J. regia* demonstraram ação antimicrobiana sobre bactérias aeróbias e anaeróbias e multirresistentes com destaque a eliminação dos biofilmes de *P. gingivalis*, *P. endodontalis*, *P. micra* e *K. pneumoniae* (multirresistentes). Os extratos

demonstraram a ausência de toxicidade e genotoxicidade conforme tempo de aplicação e concentração utilizada, além de possuírem potencial anti-inflamatório.

Palavras-chave: Antibacterianos. Fitoterapia. Anti-inflamatório. Resistência microbiana a medicamentos. *Pfaffia paniculata*. *Juglans regia*.

Ramos LP. Glycolic extracts of Pfaffia paniculata K and Juglans regia L: evaluation of antimicrobial, anti-inflammatory, cytotoxic and genotoxic potential [doctorate thesis] São José dos Campos (SP): São Paulo State University (Unesp), Institute of Science and Technology; 2020.

ABSTRACT

Antimicrobial resistance has reached alarming proportions worldwide, with deaths in Europe caused by multi-resistant microorganisms exceeding the mortality rates from AIDS, tuberculosis and influenza. Thus phytotherapy emerges in the fight against this problem, with the various biological activities of plants and their derivatives. Therefore, the objectives of the present study were to evaluate the antimicrobial, anti-inflammatory, cytotoxicity, genotoxicity and phytochemical constitution of the glycolic extracts of P. paniculata and J. regia. The action on anaerobic bacteria (Porphyromonas gingivalis, P. endodontalis, Parvimonas micra and Fusobacterium nucleatum) was carried out by means of broth microdilution tests (Protocol M11-A8 - CLSI) and on monotypic biofilms. The action on aerobes was performed on 3 strains of multi-resistant Klebsiella pneumoniae, with tests on planktonic cultures (Protocol M7-A9) and biofilms; The verification of antimicrobial activity on heterotypic biofilms of Candida albicans associated with Staphylococcus aureus, Enterococcus faecalis, Streptococcus mutans or Pseudomonas aeruginosa was also performed. The cytotoxicity and genotoxicity of the extracts were evaluated on mouse macrophages (RAW 264.7) and human keratinocytes (HaCat) by MTT and micronucleus tests, respectively. The anti-inflammatory potential was assessed by the ELISA test, TNF- α , IL-10 and IL-1 β levels were measured. The data obtained a normal distribution and the statistical analysis was performed by ANOVA and Tukey ($p < 0.05\%$). The extracts of P. paniculata and J. regia promoted CMM of 50 mg / mL for anaerobes. The biofilms of P. gingivalis and P. micra were eradicated with 100 and 200 mg / mL of the extracts (5 min) and with the concentrations of 50 and 100 mg / mL (24 hours); F. nucleatum and P. endodontalis obtained reductions ranging from 80 to 90%. The heterotypic biofilms of C. albicans and S. mutans obtained reductions of up to 80% after contact for 5 minutes with J. regia and 71% for P. paniculata. The multidrug-resistant strains of K. pneumoniae obtained reductions in metabolic activity of up to 67.9%. The P. paniculata extract promoted cell viability ranging from 61.1% to 133.8% on human keratinocytes after 24 h of contact with concentrations of 12.5 to 0.39 mg / mL, while J. regia obtained 43, 9 to 128.4% viability. Mouse macrophages obtained viability from 18.1 to 101.9% with P. paniculata and 35.4 to 60.6% for J. regia. P. paniculata promoted a reduction in the levels of the pro-inflammatory cytokine IL-1 β and an increase in the levels of the anti-inflammatory cytokine IL-10. J. regia promoted the reduction of the pro-inflammatory cytokine TNF- α . Both extracts did not promote genotoxicity against cell lines. Phytochemical analysis showed the presence of benzophenones and caffeoylquinic acid in the extracts of P. paniculata and J. regia, respectively. In conclusion, the extracts of P. paniculata and J. regia demonstrated antimicrobial action on aerobic and anaerobic and multiresistant bacteria, with emphasis on the elimination of the biofilms of P. gingivalis, P. endodontalis and P. micra, as well as the reductions of the biofilms of K. pneumoniae multidrug-resistant. The extracts demonstrated the absence of toxicity and genotoxicity according to the

time of application and concentration used, in addition to having anti-inflammatory potential.

Keywords: Anti-Bacterial agents. Phytotherapy. Anti-inflammatory. Drug resistance
Pfaffia paniculata. Juglans regia.

1 INTRODUÇÃO

Muitos são os fatores que levam ao aumento da resistência das bactérias frente aos fármacos antimicrobianos, o uso indiscriminado ou muitas vezes errôneo do fármaco, as próprias características de adaptação dos patógenos, além do aumento de pacientes imunossuprimidos são os fatores mais apontados nos estudos científicos. Estudos recentes relacionam até mesmo o uso dos desinfetantes e produtos químicos em geral, denominados de biocidas, com o aumento da resistência microbiana aos fármacos antimicrobianos, pois o uso das substâncias biocidas são muito mais frequentes e disseminados na população e muitas vezes possuem o mecanismo de ação muito semelhante ao antibiótico utilizado na clínica médica. Assim as bactérias são capazes de armazenar essas informações dentro de transposons ou integras para posteriormente incorporar esta informação ao seu genoma plasmidial e transferir isto a toda comunidade microbiana (Sargin et al., 2013; Farooqui et al., 2015; Arepyeva et al., 2017; Paul et al., 2019).

Sejam quais forem as causas, o dado mais alarmante que temos hoje, é que esta epidemia de escala global causa milhares de mortes ao ano, e dentro de poucos anos já não seremos mais capazes de promover o combate a uma simples infecção. Segundo a ganhadora do prêmio Nobel de Química, Ada Yonath responsável pela identificação da função dos ribossomos na célula animal, 33.000 europeus morrem ao ano devido a micro-organismos multirresistentes, esses valores superam o número de mortes causadas por doenças como a AIDS, Tuberculose e a gripe. A pesquisadora salienta ainda que a ausência de antibióticos eficazes fará com que a expectativa de vida da população seja de 50 a 60 anos no máximo. A urgência no desenvolvimento de novos fármacos antimicrobianos fez com que a organização mundial da saúde criasse uma lista contendo os patógenos classificados por ordem de urgência em combate e formulação de uma nova droga, assim espécies como *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa* e bactérias da família *Enterobacteriaceae* ocupam o topo desta lista, como prioridade crítica. (WHO, 2017; Ada Yonath, 2019).

O aumento da resistência a fármacos antimicrobianos abrange micro-organismos aeróbios e também anaeróbios, sendo o controle dos dois grupos de igual importância. Um aspecto interessante observado em alguns sítios de infecção é que

a recorrência e/ou agravamento de infecções promove a troca da microbiota, sendo os micro-organismos aeróbios substituídos por anaeróbios, como no caso de infecções periodontais (Jamal et al., 2015). Dentro deste contexto, a cavidade oral demonstra uma microbiota mais rica em bactérias anaeróbias, assim como indicou Aw V. (2016) onde demonstrou a prevalência das espécies *Fusobacterium nucleatum* (11.7–44%), *Parvimonas micra* (5– 28%), *Porphyromonas endodontalis* (5–61%), *Porphyromonas gingivalis* (6.7– 30%) e o gênero *Prevotella* spp. (16.7–50%), em infecções periapicais. Porém, as infecções por bactérias anaeróbias não ficam restritas a só um sítio, envolvendo também pacientes em pós-operatório com infecções intra-abdominal, infecções ginecológicas, pulmonar e infecções teciduais. Casos recorrentes de rinosinusite, onde a doença se cronifica também tem apresentado altas taxas de prevalência do grupo de anaeróbios (Ananth-shenoy et al., 2016; Brook I. 2016; Kuang et al., 2018; Abe et al., 2018).

Diante da problemática global na busca pelo combate aos micro-organismos, diversas terapias foram exploradas a fim de elucidar seu real potencial antimicrobiano, assim a fitoterapia desponta como um importante ramo de pesquisas, na busca por demonstrar o real potencial biológico de plantas e derivados. O uso da fitoterapia para o tratamento de doenças remete a milhares de anos e esse conhecimento provindo do conhecimento popular é muito disseminado na cultura oriental, indígena, entre outras, possuindo diversos frutos, raízes e árvores com diversas propriedades a se explorar (Pardeep Sharma et al., 2013; Farooqui et al., 2015).

Pfaffia paniculata é uma raiz conhecida popularmente como Ginseng brasileiro. Pertencente à família Amaranthaceae, é uma planta nativa da região Neotropical, que se estende pelos trópicos cruzando o sul do México, bacia Amazônica, Minas Gerais, Santa Catarina, Paraná até a Baía Blanca na Argentina (Freitas et al., 2009; Rodrigues et al., 2013). Existe uma grande confusão em torno da denominação de *Pfaffia paniculata*, sendo também denominada *Hebanthe eriantha*, *Hebanthe paniculata*, *Pfaffia eriantha*, entre outros. Isso é devido as divisões em tribos que a família Amaranthaceae possui, sendo elas *Pfaffia* Mart., *Hebanthe* Mart. e *Serturnera* Mart. A fim de promover uma melhor caracterização das espécies presentes no Brasil, Marchioretto et al. (2010) promoveram uma revisão de táxons na qual buscaram distinguir melhor a tribo *Pfaffia* mart, identificando 22 espécies de *Pfaffia* em solo brasileiro.

Estudos recentes que caracterizem a constituição de *P. paniculata* são escassos, Shiobara et al. (1993) foram os pioneiros nessa busca identificando um terpeno policíclico denominado ácido pfáffico, esse ácido é o composto que distingue a espécie *P. paniculata* de *P. glomerata*, sendo a última composta por ácido glomérico. As duas espécies são semelhantes morfológicamente sendo sua diferenciação possível apenas através dessas moléculas (Leal et al., 2010). Rates e Gosmann (2002) identificaram outras moléculas com importantes efeitos biológicos, além do ácido pfáffico foram descobertas outras 6 classes de saponinas. Essas saponinas são glicosídeos que foram denominados pfafosídeos, como a molécula possui 6 frações, eles as distinguiram por letras (Pfaffosídeo A, B, C, D, E e F). São creditados a essa classe de compostos o maior efeito biológico da raiz, sendo eles os responsáveis pelo combate a células tumorais e os efeitos anti-inflamatórios (Leal et al., 2010). Takemoto et al. (1983) e Nishimoto et al. (1984) reportaram a presença de alguns esteróis na composição da raiz, sendo eles β -ecdisterona, sitosteróis e estigmasterol, além de outras moléculas como Flavonoides e alantoínas. Esses compostos são amplamente utilizados na indústria farmacêutica e seus efeitos estão relacionados a regeneração celular e proteção da pele, promovendo hidratação e ação anti-inflamatória (Freitas et al., 2004; Felipe et al., 2014).

Seguindo a cultura popular a raiz é utilizada para o tratamento de diversas doenças como distúrbios gástricos, tratamento de diabetes, reumatismo e principalmente como tônico revigorante, porém as pesquisas científicas focam apenas em alguns ramos de ação do extrato, como o potencial anti-inflamatório e a capacidade de combater células tumorais. da Silva et al. (2010) avaliaram a ação do extrato da raiz em ratos com hepatocarcinoma, os animais que foram tratados com o extrato de *P. paniculata* apresentaram diminuição da proliferação de células tumorais e aumento da apoptose das células tumorais. Nagamine et al. (2009), analisando a ação do extrato butanólico em linhagem de células neoplásicas MCF-7, verificaram severas deformações morfológicas nas células, com alterações nos componentes citoplasmáticos e nucleares. Costa et al. (2015) avaliaram o efeito anti-inflamatório do extrato de *P. paniculata*, através da indução de uma doença inflamatória intestinal em ratos que após foram tratados por 14 dias com doses do extrato da raiz, com o tratamento os ratos apresentaram redução nos níveis das citocinas IL-1 β , INF- γ , TNF- α e IL-6.

A atividade antimicrobiana de *Pfaffia paniculata* é pouco conhecida sendo o trabalho de nossa equipe um dos estudos pioneiros na busca por elucidar esse potencial biológico. Testado sobre cepas ATCC 4352 de *Klebsiella pneumoniae* o extrato glicólico da *P. paniculata* foi capaz de reduzir a forma planctônica e o biofilme do micro-organismo, onde foram evidenciados os valores 12,5 mg/mL como CIM e 25 mg/mL como CMM. Em biofilme o extrato aplicado por 5 min. foi capaz de reduzir a biomassa de *K. pneumoniae* em 55,7% e a atividade metabólica em 72,3% (Paula-Ramos et al., 2016).

Em um estudo prévio (ainda não publicado), nosso grupo avaliou a ação do extrato glicólico de *P. paniculata* sobre cepas de *Candida albicans*, os resultados obtidos demonstraram reduções significativas, com valores de CIM e CMM em 50 e 100 mg/mL respectivamente. Foi avaliada também a ação do extrato em biofilmes, onde verificou-se que a aplicação do extrato na concentração 200 mg/mL por 5 min promoveu redução de 45,6% da biomassa de *C. albicans* e de 77,4% da atividade metabólica da levedura, demonstrando seu importante potencial antifúngico. Diante destes resultados, com a evidente susceptibilidade de *C. albicans* ao extrato, torna-se interessante avaliar se a interação entre a levedura e as bactérias aeróbias promoverão maior susceptibilidade do biofilme misto a aplicação do extrato, além disso, com base na escassez de informações sobre a atividade antimicrobiana de *P. paniculata*, somado aos resultados sobre *K. pneumoniae*, torna-se de interesse avaliar sua ação sobre micro-organismos anaeróbios e também aeróbios, a fim de traçar seu espectro de ação antimicrobiana.

Além de *P. paniculata* diversos outros extratos ainda são pouco estudados quanto a seus potenciais biológicos, assim podemos citar *Juglans regia*. Conhecida popularmente como Nogueira, essa árvore produz frutos com grande potencial econômico, ela pertence à família Juglandaceae sendo nativa do sudeste da Europa, onde é utilizada popularmente para o tratamento de diversas doenças (Fernández-Agulló et al., 2013; Muzaffer, et al 2018).

Estudos envolvendo a utilização do extrato de *J. regia*, indicam que a árvore e seus frutos possuem diversas finalidades terapêuticas, como atividade anti-inflamatória, anti-oxidante, antimicrobiana, anticancerígenas, depurativas e diuréticas, exibindo vários constituintes o qual fomentam estes mecanismos (Almeida et al., 2008; Hosseini et al., 2014; Farooqui et al., 2015). Na pesquisa sobre a constituição do óleo

essencial de *J. regia*, já se foram identificados 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 et al., 2000; Verma et al., 2013; Joshan et al., 2013; Panth et al., 2016).

Muzafer et al. (2019) verificaram que *J. regia* possui a capacidade de proteger as células epiteliais humanas da radiação UVB, os autores utilizaram a administração de 80 μ g/ml do extrato de flores macho de *J. regia* sobre cultura de queratinócitos humanos (HaCat) o qual haviam obtido uma exposição de 20 mJ/cm² de raios UVB. As células que receberam a aplicação do extrato demonstram uma grande diminuição dos marcadores do fotoenvelhecimento celular, demonstrando assim sua ação moduladora na resposta inflamatória causada pela radiação UVB.

São creditados também a *J. regia* a atividade antineoplásica, como demonstrado no estudo de Li et al. (2019), em que o extrato etanólico da casca verde da árvore promove a diminuição da taxa de crescimento das células neoplásicas do esôfago de humanos, utilizando as linhagens KYSE150 e EC9706. Os pesquisadores apontam que diversas proteínas conhecidas como marcadores da alteração neoplásica são diminuídos após a aplicação do extrato, além de promover a apoptose celular.

Extratos naturais podem possuir inúmeros efeitos biológicos, porém, poucos desses insumos são investigados a fundo. As pesquisas que avaliam o potencial biológico de *P. paniculata* e *J. regia* se mostram restritas a duas áreas, como atividade anti-inflamatória e potencial anti-tumoral, entretanto, os extratos naturais podem conter moléculas com diversas finalidades terapêuticas. Associando este contexto com a problemática do crescente aumento de micro-organismos multirresistentes a fármacos antimicrobianos, torna-se importante investigar as diversas finalidades biológicas que esses extratos podem possuir, a fim de elucidar suas propriedades terapêuticas, determinando assim sua aplicabilidade em um processo infeccioso de interesse médico-odontológico.

2 PROPOSIÇÃO

2.1 Objetivo geral

Os objetivos do presente trabalho foram avaliar a ação antimicrobiana, citotoxicidade, potencial anti-inflamatório, genotoxicidade, atividade supressora de radicais livres, além da composição fitoquímica dos extratos glicólicos de *Pfaffia paniculata* K. e *Juglans regia* L.

2.2 Objetivos específicos

Os objetivos específicos foram:

- a) avaliar a atividade antimicrobiana dos extratos glicólicos de *Pfaffia paniculata* e *Juglans regia* sobre cepas-padrão (ATCC) de *Porphyromonas gingivalis*, *Porphyromonas endodontalis*, *Parvimonas micra* e *Fusobacterium nucleatum* em cultura planctônica, verificando a concentração inibitória mínima (CIM), concentração microbicida mínima (CMM) e também sua ação antibiofilme;
- b) avaliar a atividade antimicrobiana dos extratos de *Pfaffia paniculata* e *Juglans regia* sobre cepas multirresistentes de *Klebsiella pneumoniae*, verificando a concentração inibitória mínima (CIM), concentração microbicida mínima (CMM) e também sua ação antibiofilme;
- c) avaliar a atividade antibiofilme dos extratos sobre biofilmes heterotípicos de *Candida albicans* associada a uma bactéria, sendo elas *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus faecalis*, *Streptococcus mutans* ou *Pseudomonas aeruginosa*;

- d) avaliar a citotoxicidade e genotoxicidade dos extratos sobre culturas de macrófagos de camundongo (RAW 264.7) e queratinócitos humanos (HaCat), pelo ensaio de MTT e teste de micronúcleos;
- e) avaliar a atividade anti-inflamatória do extrato sobre culturas de macrófagos de camundongo (RAW 264.7) estimulados por lipopolissacarídeo (LPS) de *Escherichia coli*, pela produção de citocinas pró e anti-inflamatórias (IL-1 β , TNF- α e IL-10);
- f) avaliar a constituição fitoquímica dos extratos através da cromatografia Líquida de camada Gasosa (HPLC);
- g) avaliar a atividade supressora de radicais livres dos extratos.

3 MATERIAL E MÉTODOS

Foram adquiridos os extratos glicólicos de *Pfaffia paniculata* K. (lote: PRODO19544) e *Juglans regia* L. (lote: PRODO18746) da empresa Mapric (São Paulo, SP), com os devidos laudos e especificações (Anexos), comprovando a autenticidade das espécies vegetais. O extrato de *P. paniculata* foi preparado a partir da própria raiz, enquanto o extrato de *J. regia* foi preparado a partir das folhas da árvore, ambos foram formulados na concentração de 20% (200 mg/mL do extrato) incorporados a 80% de propilenoglicol.

3.1 Avaliação da atividade antimicrobiana do extrato

A avaliação antimicrobiana foi realizada sobre diferentes espécies microbianas de interesse médico-odontológico, sendo elas de metabolismo anaeróbios, aeróbios e também com perfil multirresistente a fármacos antimicrobianos.

3.1.1 Anaeróbios

A ação antimicrobiana sobre anaeróbios foi avaliada sobre as cepas de referência (ATCC - American Type Culture Collection) de *Porphyromonas gingivalis* (W83), *Porphyromonas endodontalis* (ATCC 35406), *Parvimonas micra* (ATCC 33270) e *Fusobacterium nucleatum* (ATCC 25586), provenientes do Laboratório de Endodontia da faculdade de Odontologia de Bauru – USP.

3.1.1.1 Determinação da concentração inibitória mínima (CIM) e concentração microbicida Mínima (CMM) para os micro-organismos anaeróbios

Para a determinação da CIM foi utilizado o método de microdiluição em caldo, segundo Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI), protocolo M11-A8 (2012). Para isso os inóculos foram preparados em solução salina estéril 0,9%, a partir de culturas crescidas em ágar Brucella (Himedia, Mumbai, India) enriquecido com sangue de carneiro desfibrinado (5%) (New Prov, Pinhais, Brasil), Hemina (1%) (Merck, Darmstadt, Germany) e Menadiona (1%) (Merck, Darmstadt, Germany) com 48 h incubação em câmara de anaerobiose (Whitley DG250 Workstation, UK). A padronização dos inóculos foi realizada através da escala McFarland, utilizando a escala 0,5 correspondente a concentração de $1,5 \times 10^8$ UFC/mL.

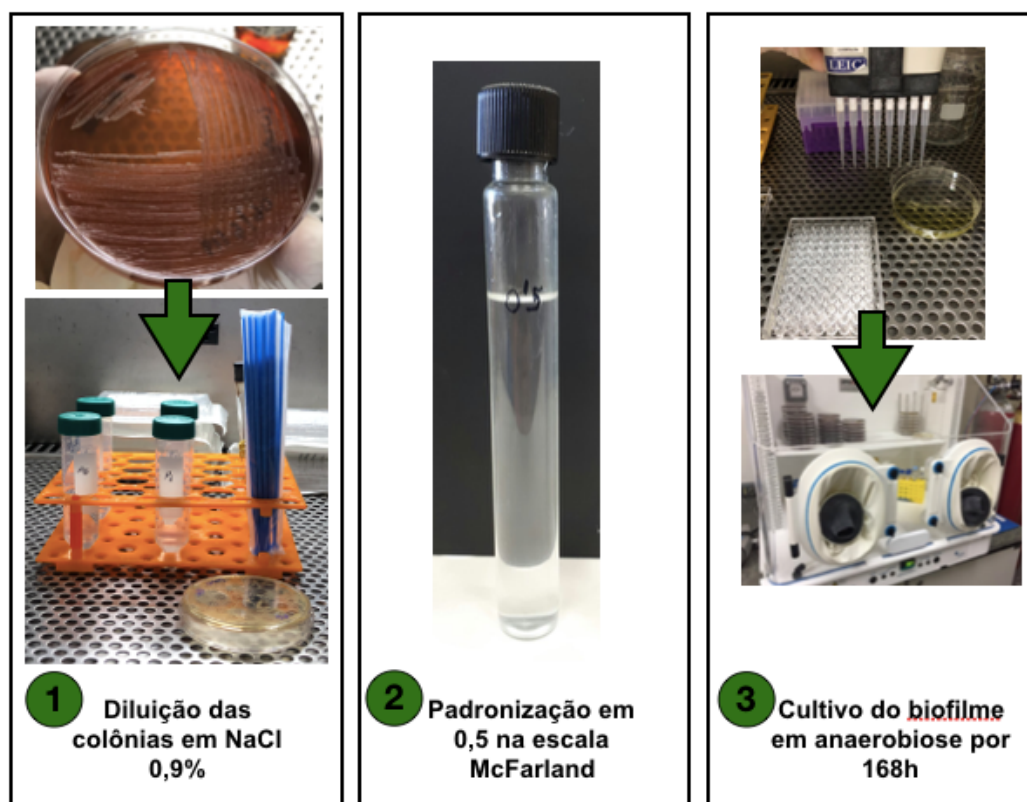
O teste foi realizado em microplacas de 96 poços, onde cada grupo experimental abrigou 8 diferentes diluições dos extratos testados, variando de 50 a 0,39 mg/mL, realizando o procedimento em duplicata. Para isso, foram adicionados 100 µL/poço do caldo Brucella (Himedia, Mumbai, India) enriquecido com sangue de carneiro desfibrinado (5%) (New Prov, Pinhais, Brasil), Hemina (1%) (Merck, Darmstadt, Germany) e Menadiona (1%) (Merck, Darmstadt, Germany). Após adição do meio de cultivo em todos os poços de cada grupo experimental, foram adicionados 100 µL dos extratos apenas no primeiro poço de cada grupo, de onde foram realizadas 10 diluições seriadas do extrato. Em seguida foi adicionado 100 µL/poço do inóculo do microorganismo, respeitando cada grupo experimental. Após incubação de 48 h em câmara de anaerobiose, a CIM foi determinada no último poço de cada grupo experimental que não apresentou turvação, indicando a ausência de crescimento microbiano.

Para determinação da CMM dos extratos foi necessário semear 10 µL da CIM, bem como 10 µL de uma concentração acima e de uma concentração abaixo dela em ágar Brucella enriquecido. Após 48 h de incubação em câmara de anaerobiose, a menor concentração que não apresentou crescimento de colônias, foi determinada como a CMM.

3.1.1.2 Avaliação da atividade antimicrobiana do extrato sobre biofilmes monotípicos de bactérias anaeróbias

Para a formação dos biofilmes foram preparadas suspensões microbianas, a partir de culturas com 48 h de crescimento em ágar Brucella enriquecido com sangue (5%), Hemina (1%) e Menadiona (1%). As suspensões foram preparadas a partir da diluição das colônias bacterianas em solução salina estéril a 0,9% (figura 1), seguido pela padronização com escala McFarland utilizando a turbidez 0,5 correspondente a concentração de $1,5 \times 10^8$ UFC/mL. Após, as suspensões padronizadas foram distribuídas em placas de microtitulação de 96 poços (TPP, Suíça) no volume de 100 µL/poço, em seguida foram adicionados 100 µL/poço do Caldo Brucella enriquecido com sangue (5%), Hemina (1%) e Menadiona (1%) para nutrição do biofilme. As placas foram incubadas em câmara de anaerobiose por 168 h/37°C, com troca do meio de cultivo a cada 48 h.

Figura 1 - Preparo do Biofilme monotípico das bactérias anaeróbias



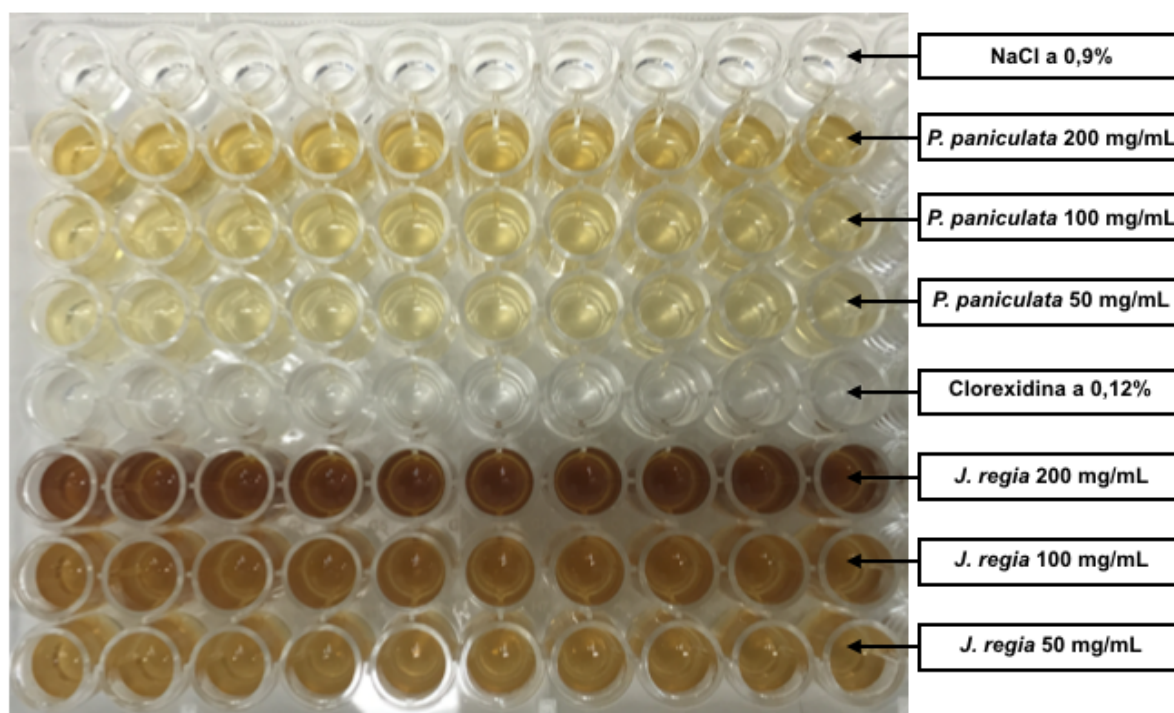
Fonte: Elaborado pelo próprio autor.

3.1.1.2.1 Aplicação dos tratamentos e contagem de UFC/mL

Passado o período de formação de cada biofilme, o mesmo foi colocado em contato com os extratos separadamente, pelos períodos de 5 min. utilizando as concentrações de 200, 100 e 50 mg/mL (Figura 2), e o período de 24 h que utilizou as concentrações de 100, 50 e 25 mg/mL. Como controle negativo foi utilizado solução salina estéril (0,9%) e como controle positivo foi utilizada a solução de digluconato de clorexidina a 0,12%. Posteriormente a aplicação dos tratamentos, os biofilmes foram lavados por 3 vezes com solução salina estéril (0,9%), após a realização da última lavagem foram adicionados 100 µL/poço para promover a desagregação dos biofilmes formados no fundo da placa, realizada através do homogeneizador ultrassônico

(Sonoplus HD 2200 – Bandelin Eletronic) com potência de 50 W pelo tempo de 30 segundos.

Figura 2 - Aplicação dos tratamentos sobre os biofilmes formados por 168 h



Fonte: Elaborado pelo próprio autor.

Após desagregação, as soluções contidas na microplaca de 96 poços foram diluídas seriadamente na base 10, para cada grupo experimental, utilizando as diluições 10^{-2} , 10^{-4} e 10^{-6} para semeadura em ágar Brucella enriquecido com sangue (5%) Hemina (1%) e Menadiona (1%). Foi utilizado o volume de 10 μ l para a semeadura, seguido pela incubação das placas por 48 h em câmara de anaerobiose. Foram realizados 3 experimentos independentes, com 4 repetições cada, totalizando n=12 para cada grupo experimental.

Após o período de incubação, as placas foram submetidas ao processo de contagem de colônias, após a contagem foi aplicado o cálculo de contagem de UFC/

ml, considerando os valores de diluição empregados. Após determinação da contagem de UFC/ml os valores foram convertidos em UFC/ml (Log10).

3.1.2 Aeróbios

A ação antimicrobiana sobre aeróbios foi avaliada de duas formas, primeiramente foram realizados testes sobre biofilmes heterotípicos compostos pela levedura *C. albicans* associada a uma bactéria, sendo elas *S. aureus*, *S. mutans*, *E. faecalis* ou *P. aeruginosa*. A segunda verificação do potencial antimicrobiano dos extratos sobre micro-organismos aeróbios foi realizada sobre culturas planctônicas e biofilmes monotípicos de *Klebsiella pneumoniae* multirresistentes a fármacos antimicrobianos.

Para os testes em biofilmes heterotípicos foram utilizadas as cepas de referência de *Candida albicans* (ATCC 18804), *Staphylococcus aureus* (ATCC 6538), *Enterococcus faecalis* (ATCC 4083), *Streptococcus mutans* (ATCC 35688) e *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 15442), provenientes do Laboratório de Microbiologia e Imunologia do Curso de Odontologia do ICT – UNESP.

A avaliação antimicrobiana sobre bactérias multirresistentes foi realizada sobre 3 cepas de *K. pneumoniae* (400381, 367725 e 386546), provenientes do banco de cepas do laboratório Bioclin de São José dos Campos, isoladas de amostras de sangue, urina ou swab anal. O perfil de resistência dos isolados clínicos foi verificado por meio do sistema semi-automatizado AutoScan 4, o qual realiza o teste de microdiluição em caldo para verificar a sensibilidade frente aos antimicrobianos, os dados de sensibilidade das cepas utilizadas estão expressos no quadro 1.

Quadro 1 - Perfil de resistência dos isolados clínicos

	367725	386546	400381
Amicacina	INT	SEN	RES
Amoxilina + Ác. Clavulânico	RES	RES	RES
Ampicillina	RES	RES	RES
Ampicillina-sulbactam	RES	RES	RES
Aztreonam	RES	RES	RES
Cefepime	RES	RES	RES
Cefotaxime	RES	RES	RES
Ceftazidime	RES	RES	RES
Cefuroxima	RES	RES	RES
Ciprofloxacina	RES	RES	RES
Colistina	SEN	SEN	SEN
Gentamicina	RES	RES	RES
Ertapenem	RES	RES	RES
Fosfomicina	RES	RES	RES
Imipenem	RES	RES	RES
Levofloxacino	RES	RES	RES
Meropenem	RES	RES	RES
Piperacillina-tazobactam	RES	RES	RES
Tigeciclina	INT	RES	SEN
Tobramicina	RES	RES	RES
Trimetropim-sulfametaxazol	RES	RES	RES

Legenda: SEN – Sensível, INT - Intermediário - RES - Resistente.

Fonte: Elaborado pelo próprio autor

3.1.2.1 Determinação da CIM e CMM sobre aeróbios multirresistentes

Para a determinação da CIM e CMM foi utilizado o protocolo M7-A9, segundo a CLSI, que discorre sobre o método de microdiluição em caldo em bactérias aeróbias. Para isso, inicialmente foram preparados as suspensões bacterianas, a partir de culturas crescidas em ágar Brain Heart Infusion - BHI (Himedia, Mumbai, India) com 24 h de incubação a 37°C. As colônias foram diluídas em solução salina estéril (0,9%) e após padronizadas em espectrofotômetro (Micronal B582, São Paulo, Brasil) na concentração de 10^6 UFC/mL.

Após foi realizado a diluição dos extratos glicólicos em caldo Mueller Hinton (Himedia, Mumbai, India) em placas de microtitulação de 96 poços, para isso 100 µl/poço do caldo foram dispensados em 10 poços de cada grupo experimental, em seguida 100 µl do extrato de *P. paniculata* ou de *J. regia* foram adicionados apenas no primeiro poço de cada grupo, de onde foram realizadas 10 diluições seriadas. Os testes foram realizados em duplicata. Após o preparo das diluições, os grupos experimentais receberam a adição de 100 µl/poço da suspensão padronizada dos micro-organismo, com posterior incubação da placa de microtitulação por 24 h/ 37°C. Passado o período de incubação foi realizada a verificação da turbidez dos poços, onde o primeiro poço que contivesse a menor concentração do extrato e não apresentasse turvação, indicativo da ausência de crescimento microbiano, o mesmo foi selecionado como a CIM.

A CMM foi determinada a partir da semeadura de alíquotas retiradas da microplaca de 96 poços, onde a alíquota com menor concentração do extrato que não apresentasse crescimento de colônias em ágar BHI com 48 h de incubação a 37°C foi determinada como Concentração microbicida mínima.

3.1.2.2 Biofilmes heterotípicos e monotípicos de aeróbios

Para a estruturação dos biofilmes monotípicos e heterotípicos primeiramente foi realizada a preparação das suspensões microbianas, onde colônias dos respectivos microorganismos foram diluídas em solução salina estéril (0,9%). Após as suspensões foram padronizadas em espectrofotômetro, na concentração de 10^7 UFC/mL, em seguida as mesmas foram distribuídas em placas de 96 poços conforme cada grupo experimental, sendo que os biofilmes heterotípicos foram constituídos de 50 µl/poço da suspensão padronizada de *C. albicans* e 50 µl/poço da suspensão de uma das bactérias aeróbias, sendo elas *S. aureus*, *S. mutans*, *E. faecalis* ou *P. aeruginosa*. Já os biofilmes monotípicos de *K. pneumoniae* foram estruturados a partir de 100 µl/poço da suspensão padronizada. Os biofilmes foram nutridos com 100 µl/poço de caldo BHI, com renovação do meio de cultivo em 24 h. As microplacas foram mantidas em estufa a 37°C por 48 h, após incubação foram destinadas aos seus respectivos tratamentos.

3.1.2.2.1 Aplicação dos tratamentos sobre biofilmes heterotípicos e monotípicos de aeróbios

Os biofilmes heterotípicos foram tratados utilizando a aplicação das concentrações de 200, 100 e 50 mg/mL do extrato de *P. paniculata* ou *J. regia* pelo tempo de 5 min. Como controle negativo foi utilizada solução salina estéril a 0,9%. Para a aplicação dos extratos pelo tempo de 24 h será utilizado as concentrações de 100, 50 e 25 mg/mL dos respectivos extratos, o qual serão diluídos em meio de cultivo BHI para que possa haver nutrição aos micro-organismos durante o tempo de aplicação. Como controle negativo foi utilizada a aplicação do caldo BHI. Os biofilmes monotípicos das cepas multirresistentes de *K. pneumoniae* foram tratados apenas pelo período de 5 min. utilizando as concentrações de 100, 50 e 25 mg/mL, como controle negativo se foi utilizado a aplicação de solução salina estéril a 0,9%.

Ao término do tempo de aplicação dos tratamentos, os mesmos foram descartados, seguido pela lavagem por 3 vezes com 200 µl/poço de solução salina a 0,9% para remoção das células afetadas pelos tratamentos. Os biofilmes foram encaminhados aos testes de mensuração da densidade da biomassa (teste de cristal

violeta) ou então para o teste de avaliação da atividade metabólica dos micro-organismos (teste de MTT).

3.1.2.2.2 Avaliação da biomassa pelo teste do cristal violeta

Após o termino dos processos de tratamento e lavagem dos respectivos biofilmes, foram adicionados 200 µL/ poço de metanol por 20 min. para fixação do biofilme, em seguida o metanol foi retirado e a placa foi incubada a 37°C por 24 h. Após secagem 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 convertidas na biomassa do biofilme, através da fórmula abaixo:

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

3.1.2.2.3 Atividade metabólica dos micro-organismos pelo teste de MTT

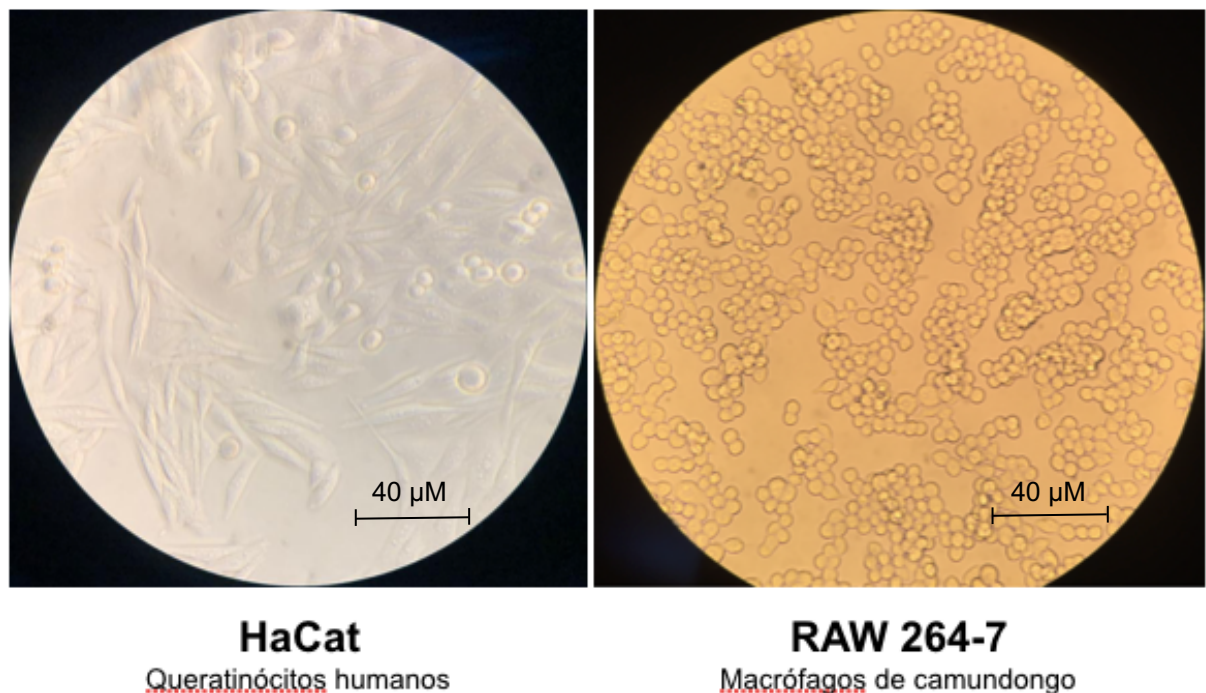
Após submetido aos respectivos tratamentos o biofilme foi encaminhado para o teste de MTT, para isso foram adicionados 200 µL/poço da solução de MTT (3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-Diphenyltetrazolium Bromide) mantida em contato com as células microbianas por 1 hora em estufa a 37°C, ao abrigo da luz. Passado o período de incubação a solução de MTT foi retirada seguido pela adição de 200 µL de Dimetilsufóxido (DMSO). A placa foi novamente incubada em estufa a 37°C por 10 min. e colocada no Shaker sobe agitação constante por 10 min. Após a placa será lida em leitora de microplaca em 570 nm, as densidades ópticas obtidas serão convertidas, através da fórmula abaixo, em percentual de atividade metabólica das células do micro-organismo:

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

3.2 Testes em células

Foram realizadas as análises da atividade citotóxica, genotóxica dos extratos de *P. paniculata* e *J. regia* sobre as linhagens de macrófagos de camundongos (RAW 264.7) e queratinócitos humanos (HaCat) (Figura 3). A análise anti-inflamatória foi realizada sobre macrófagos de camundongos (RAW 264.7). Ambas as células são provenientes do Banco de Células do Rio de Janeiro - Associação Técnico Científica Paul Ehrlich (APABCAM – RJ).

Figura 3 - Culturas celulares reativadas em meio DMEM suplementado com 10% de soro fetal bovino



Fonte: Elaborado pelo próprio autor.

3.2.1 Cultivo, manutenção e contagem celular

As linhagens de células (RAW 264-7 e HaCat) foram cultivadas em meio de Eagle modificado por Dulbecco (DMEM - LGC Biotecnologia, Cotia, Brasil), com alta concentração de glicose, suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB) (Invitrogen, Nova York, EUA) e mantidas em frascos de cultivo celular (TPP, Suíça), incubadas em estufa à temperatura de 37°C, com umidade atmosférica e 5% de CO₂.

Durante o processo de expansão celular o meio de cultivo foi substituído a cada 48 h e a partir do momento em que se fosse observado o estado de subconfluência das células, caracterizado pela ocupação de mais de 70% do frasco, as mesmas foram repassadas para frascos de cultivo maiores ou utilizadas para os testes.

Para a desagregação celular, a monocamada de células foi removida do assoalho do frasco de cultura, com auxílio de um varredor celular (para RAW 264.7) ou tripsina (para Queratinócitos HaCat). As células suspendidas foram transferidas para um tubo de centrifugação (Sarstedt, Numbrecht, Alemanha) e submetidas a centrifugação por 5 min a 3000 rpm, promovendo assim a remoção do meio de cultivo consumido, seguido pela substituição por meio de cultivo fresco.

Para a contagem celular, alíquotas de 10 e 50 µL da suspensão de células foram misturadas a 90 e 50 µL, respectivamente, ao corante azul de Trypan, obtendo as diluições 1/2 e 1/10. Em seguida as diluições foram transferidas para a câmara de Neubauer, onde foi realizada a contagem de células viáveis. Após contagem dos 4 quadrantes laterais da câmara, foi realizada uma média dos resultados obtidos, sendo a média multiplicada pelo valor da diluição empregada na contagem, assim, foi obtido o valor de células por mL de solução utilizando o valor de correção do volume da câmara (10⁴).

3.2.2 Avaliação da citotoxicidade dos extratos

A avaliação da citotoxicidade dos extratos de *P. paniculata* e *J. regia* foi realizada por meio do teste colorimétrico de MTT, avaliando a atividade enzimática celular. Para tanto, as culturas de macrófagos de camundongos (RAW 264.7) e Queratinócitos humanos (HaCat), foram transferidas para microplacas de 96 poços (TPP) na concentração de 2×10^4 células viáveis e cultivadas em 200 μ L de meio DMEM + 10% SFB. Após as placas foram incubadas (37°C, com 5% de CO₂) por 24 h para a aderência celular.

Passado o período de incubação, o sobrenadante foi descartado, e as células foram expostas aos tratamentos que variaram a concentração conforme o tempo de aplicação. Para o período de 5 min. de contato com os tratamentos as células receberam a aplicação dos extratos de *P. paniculata* e *J. regia* com concentrações variando de 200 mg/mL a 0,39 mg/mL, além de solução salina a 0,9% como controle negativo e digluconato de clorexidina a 0,12% como controle positivo, conforme observado no quadro 2. Os tratamentos aplicados por 24 h contaram com a aplicação dos extratos nas concentrações de 150 a 0,39 mg/mL, como controle negativo foi utilizado o meio de cultivo DMEM + 10% SFB e como controle positivo foi aplicado a solução de digluconato de clorexidina a 0,12% diluída no meio de cultivo DMEM + 10% SFB, obtendo portanto a concentração de clorexidina a 0,06% (Oliveira et al., 2013 e 2014).

Quadro 2 - Tratamentos realizados sobre as culturas de macrófagos de camundongo (RAW 264-7), Queratinócitos humanos (HaCat) e Fibroblastos de camundongo (L929) pelos periodos de 5 min. e 24 h

Concentração	5 min.		Concentração	24 h	
	<i>P. paniculata</i>	<i>J. regia</i>		<i>P. paniculata</i>	<i>J. regia</i>
200 mg/mL	n=10	n=10	150 mg/mL	n=10	n=10
100 mg/mL	n=10	n=10	100 mg/mL	n=10	n=10
50 mg/mL	n=10	n=10	50 mg/mL	n=10	n=10
25 mg/mL	n=10	n=10	25 mg/mL	n=10	n=10
12,5 mg/mL	n=10	n=10	12,5 mg/mL	n=10	n=10
6,25 mg/mL	n=10	n=10	6,25 mg/mL	n=10	n=10
3,12 mg/mL	n=10	n=10	3,12 mg/mL	n=10	n=10
1,56 mg/mL	n=10	n=10	1,56 mg/mL	n=10	n=10
0,78 mg/mL	n=10	n=10	0,78 mg/mL	n=10	n=10
0,39 mg/mL	n=10	n=10	0,39 mg/mL	n=10	n=10
Clorex 0,12%	n=10	n=10	Clorex 0,06%	n=10	n=10
NaCl 0,9%	n=10	n=10	DMEM + SFB	n=10	n=10

Legenda: Clorex 0,12%: Solução de clorexidina a 0,12%; Clorex 0,06%: Solução de clorexidina a 0,06%; NaCl 0,9%: Solução salina estéril a 0,9%; DMEM + SFB: Meio de Eagle modificado por Dulbecco suplementado com 10% de Soro fetal bovino; n: número de repetições utilizada por grupo experimental.
Fonte: Elaborado pelo próprio autor

Após, os tratamentos foram descartados e os poços lavados por 3 vezes com PBS (*Phosphate Buffer Saline*) (Cultilab, Brasil) para retirar células afetadas pelos tratamentos. Em seguida, para verificação da atividade metabólica da cultura celular, foi utilizada a solução de MTT, preparada a partir da suspensão de 0,5 mg do pó de MTT (Sigma, Missouri, EUA) em 1 mL de DMEM + 10% SFB. A solução foi transferida

para as microplacas de 96 poços no volume de 100 µL/poço, seguido pela incubação ao abrigo da luz (37°C, com 5% de CO₂) por 1 h. Posteriormente a solução foi descartada e 100 µL/poço de dimetilsulfóxido (DMSO – Sigma) foram adicionados a placa para expor os cristais de formazina produzidos pela 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 empregando-se a seguinte fórmula:

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

3.2.3 Avaliação da atividade anti-inflamatória dos extratos em macrófagos de camundongos (RAW 264-7)

Foram cultivados em placas de 24 poços, 5.10⁵ células/mL de macrófagos (RAW 264.7) por 24 h. Após o período de adesão celular, o sobrenadante foi descartado e as células foram destinadas a seus respectivos tratamentos, onde o extrato de *P. paniculata* foi aplicado na concentração de 50 e 25 mg/mL, já o extrato de *J. regia* foi aplicado nas concentrações de 1,56 e 0,78 mg/mL, ambos diluídos em meio de cultivo DMEM + 10% de SFB. As concentrações escolhidas para o teste anti-inflamatório foram baseados em dois aspectos, sendo eles os resultados obtidos pelo teste citotoxicidade (MTT) e os dados obtidos em literatura, onde o extrato de *P. paniculata* apresenta muitos relatos de sua atividade anti-inflamatória (Rates, Gosmann 2012; Costa et al., 2015) selecionando assim a aplicação de uma concentração um pouco mais alta do extrato. Os grupos experimentais contaram ainda com a aplicação dos extratos diluídos em DMEM + 10% de SFB acrescidos de 1 µg/mL/poço de lipopolissacarídeo (LPS) de *Escherichia coli* (Sigma, Missouri, EUA), conforme mostra o quadro 3. Os grupos controle foram compostos por aplicação de DMEM suplementado com 10% de SFB como controle negativo e como controle positivo se foi utilizado DMEM + 10% SFB acrescido de 1 µg/mL/poço de

lipopolissacarídeo (LPS) de *Escherichia coli*. Após as placas foram incubadas por 24 h (37°C e 5% de CO₂).

Quadro 3 - Grupos experimentais da análise anti-inflamatória dos extratos de *P. paniculata* e *J. regia*

Grupos experimentais	Composição	RAW (264-8)	HaCat
Controle (-)	DMEM + 10% SFB	n= 12	n= 12
Controle (+)	DMEM + 10% SFB + 1 µg/mL de LPS/mL	n= 12	n= 12
PFA 50 mg/mL	DMEM + 10% SFB + Extrato de PFA	n= 12	n= 12
PFA 25 mg/mL	DMEM + 10% SFB + Extrato de PFA	n= 12	n= 12
PFA 50 mg/mL + LPS	DMEM + 10% SFB + Extrato de PFA + 1 µg/mL de LPS/mL	n= 12	n= 12
PFA 25 mg/mL + LPS	DMEM + 10% SFB + Extrato de PFA + 1 µg/mL de LPS/mL	n= 12	n= 12
JUG 1,56 mg/mL	DMEM + 10% SFB + Extrato de JUG	n= 12	n= 12
JUG 0,78 mg/mL	DMEM + 10% SFB + Extrato de JUG	n= 12	n= 12
JUG 1,56 mg/mL + LPS	DMEM + 10% SFB + Extrato de JUG + 1 µg/mL de LPS/mL	n= 12	n= 12
JUG 0,78 mg/mL + LPS	DMEM + 10% SFB + Extrato de JUG + 1 µg/mL de LPS/mL	n= 12	n= 12

Legenda: PFA 50 mg/mL: Extrato glicólico de *P. paniculata* na concentração de 50 mg/mL; PFA 25 mg/mL: Extrato glicólico de *P. paniculata* na concentração de 25 mg/mL; JUG 1,56 mg/mL: Extrato glicólico de *J. regia* na concentração de 1,56 mg/mL; JUG 0,78 mg/mL: Extrato glicólico de *J. regia* na concentração de 0,78 mg/mL; n: Tamanho amostral dos grupos experimentais.

Fonte: Elaborado pelo próprio autor

Posteriormente, o sobrenadante foi coletado e armazenado sob refrigeração (-20°C) com posterior quantificação de citocinas pró-inflamatórias (IL-1 β e TNF- α) e anti-inflamatória (IL-10), pelo teste imunoenzimático (ELISA).

3.2.3.1 Quantificação de citocinas - ensaio imunoenzimático ELISA

Placas de microtitulação de 96 poços (Nunc) foram sensibilizadas com anticorpos de captura anti-TNF- α , anti-IL-1 β ou anti IL-10 de camundongo (Kits R&D Systems, NE) mantidas *overnight* em temperatura ambiente. No dia seguinte, as placas foram lavadas com PBS contendo Tween 20 (PBS-T) e bloqueadas com soro albumina bovina (BSA, 0,1%) por 1 hora. Após, as placas foram lavadas com PBS-T, seguido pela adição dos sobrenadantes da cultura de células (100 μ L por poço) e os padrões das citocinas com concentrações conhecidas (curva-padrão). Os testes foram realizados em duplicata. Após duas h de contato com os sobrenadantes, as placas foram lavadas (PBS-T), após foram acrescentados os anticorpos de detecção anti-TNF- α , anti-IL-1 β ou anti-IL-10 marcados com biotina. Após 2 h de incubação a reação foi revelada com solução contendo substrato cromogênico e peróxido de hidrogênio. A reação colorimétrica foi bloqueada, após 20 min., com ácido sulfúrico 2N. As densidades ópticas (DO) foram obtidas no leitor de microplacas (Biotek) com comprimento de onda de 450 nm e analisados estatisticamente através do programa GraphPad Prism 5.0.

3.2.4 Avaliação da genotoxicidade dos extratos (teste de micronúcleos)

Para o teste, 3×10^5 células/mL foram cultivadas em microplacas de 96 poços com 1 mL de meio DMEM + 10% de SFB por 24 h a 37°C em atmosfera de 5% CO₂. Após adesão celular, as células foram expostas aos grupos experimentais, sendo os extratos diluídos em DMEM + 10% SFB na concentração de 50 e 25 mg/mL para *P. paniculata* e 1,56 e 0,78 mg/mL para *J. regia*. O grupo controle negativo recebeu a aplicação apenas do meio de cultivo DMEM + 10% de SFB, já o grupo controle positivo recebeu a aplicação do etilmetano sulfanato - EMS (Sigma, Missouri, EUA) na concentração de 5 mM, ambos os tratamentos aplicados por 24 h.

Após os tratamentos, as células foram lavadas com PBS por 3 vezes e incubadas com citocalasina B (Sigma-Aldrich) na concentração de 6 μ g/mL por 24 h

a 37°C em atmosfera de 5% CO₂ para inibir a citocinese e induzir o acúmulo de células binucleadas. Passado o período de incubação as células foram fixadas em metanol 100% por 20 min, seguido pela coloração com DAPI (Sigma, Missouri, EUA), o corante foi retirado após 5 min. de contato com as células, logo após foram realizadas lavagens com PBS. A análise dos micronúcleos foi realizada em parceria com a Profa. Dra. Cristina Pacheco Soares, no laboratório de Dinâmica de compartimentos celulares da Universidade do Vale do Paraíba, utilizando microscópio de fluorescência (Leica DFC310FX) com o aumento de 40X, avaliando 2.000 células/poço.

3.3 Análise fitoquímica do extrato

A análise fitoquímica do extrato de *P. paniculata* e *J. regia* foi realizada em parceria com a Profa Dra Maria Cristina Marcucci Ribeiro, no Laboratório de Produtos Naturais e Quimiometria, Programa de Mestrado Profissional em Farmácia, da Universidade Anhanguera de São Paulo.

3.3.1 HPLC

O extrato foi analisado por cromatográfica em HPLC, onde foi usado o método analítico no equipamento HPLC Merck Hitachi – Lachrom série L7000, existente no laboratório de produtos naturais, UNIAN-SP, utilizando na separação a coluna C18 Lichrochart-Lichrospher Merck (Darmstadt, Alemanha) 100 RP-18 - 5 µm, 12,5 cm, otimizando-se as condições de temperatura e eluição, para obtenção de cromatogramas que mostram os picos de substâncias químicas passíveis de serem eleitas marcadores, obtidas em corridas conjuntas no mesmo sistema e com leitura no detector de rede de diodos (DAD) disponível no equipamento.

3.4 Avaliação da Atividade Supressora de Radicais Livres

A avaliação foi feita com base na redução do radical 2,2'-difênil-1-picrilhidrazila (DPPH) em solução de etanol, o qual apresenta o máximo de absorção a 515-528 nm. Ao fixar um hidrogênio, abstraído ao antioxidante em estudo, observa-se uma diminuição na absorbância, o que permite calcular após estabelecimento do equilíbrio da reação, a quantidade de antioxidante gasta para reduzir 50% do DPPH (CE 50).

3.5 Análise estatística

Os dados que obtiveram distribuição normal, avaliada pelos testes de Kolmogorov e Shapiro wilk, foram analisados estatisticamente pelo método ANOVA complementado pelo Teste de Tukey, com nível de significância de 5% ($p \leq 0,05$). Já os dados que não apresentaram distribuição normal foram analisados pelo teste de Kruskal wallis suplementado pelo teste de Dunn's com nível de significância de 5% ($p \leq 0,05$).

4 RESULTADOS

4.1 Avaliação da atividade antimicrobiana dos extratos de *P. paniculata* e *J. regia*

Devido as múltiplas análises realizadas sobre micro-organismos com diferentes perfis metabólicos, e em diferentes condições, os resultados foram divididos em 3 subitens, demonstrado o perfil de ação dos extratos sobre bactérias anaeróbias (4.1.1), Biofilmes heterotípicos de bactérias aeróbias associadas a levedura *C. albicans* (4.1.2); a análise sobre *Klebsiella pneumoniae* multirresistente (4.1.3).

4.1.1 Ação antimicrobiana dos extratos de *P. paniculata* e *J. regia* sobre bactérias anaeróbias

Os extratos glicólicos de *P. paniculata* e *J. regia* demonstraram ação antimicrobiana sobre as bactérias anaeróbias, causadoras da doença periodontal, exibindo valores de CMM além de promover atividade antibiofilme.

4.1.1.1 Ação antimicrobiana dos extratos de *P. paniculata* e *J. regia* sobre culturas planctônicas de bactérias anaeróbias

Não foi possível identificar o valor da CIM para ambos os extratos devido a coloração do meio de cultura empregado, haja vista que o mesmo é suplementado com sangue, hemina e menadiona. O extrato de *P. paniculata* aplicado sobre culturas planctônicas de *P. gingivalis*, *P. endodontalis*, *F. nucleatum*, *P. micra* e *P. intermedia* demonstrou ação antimicrobiana, obtendo CMM de 50 mg/mL frente a todas as bactérias testadas.

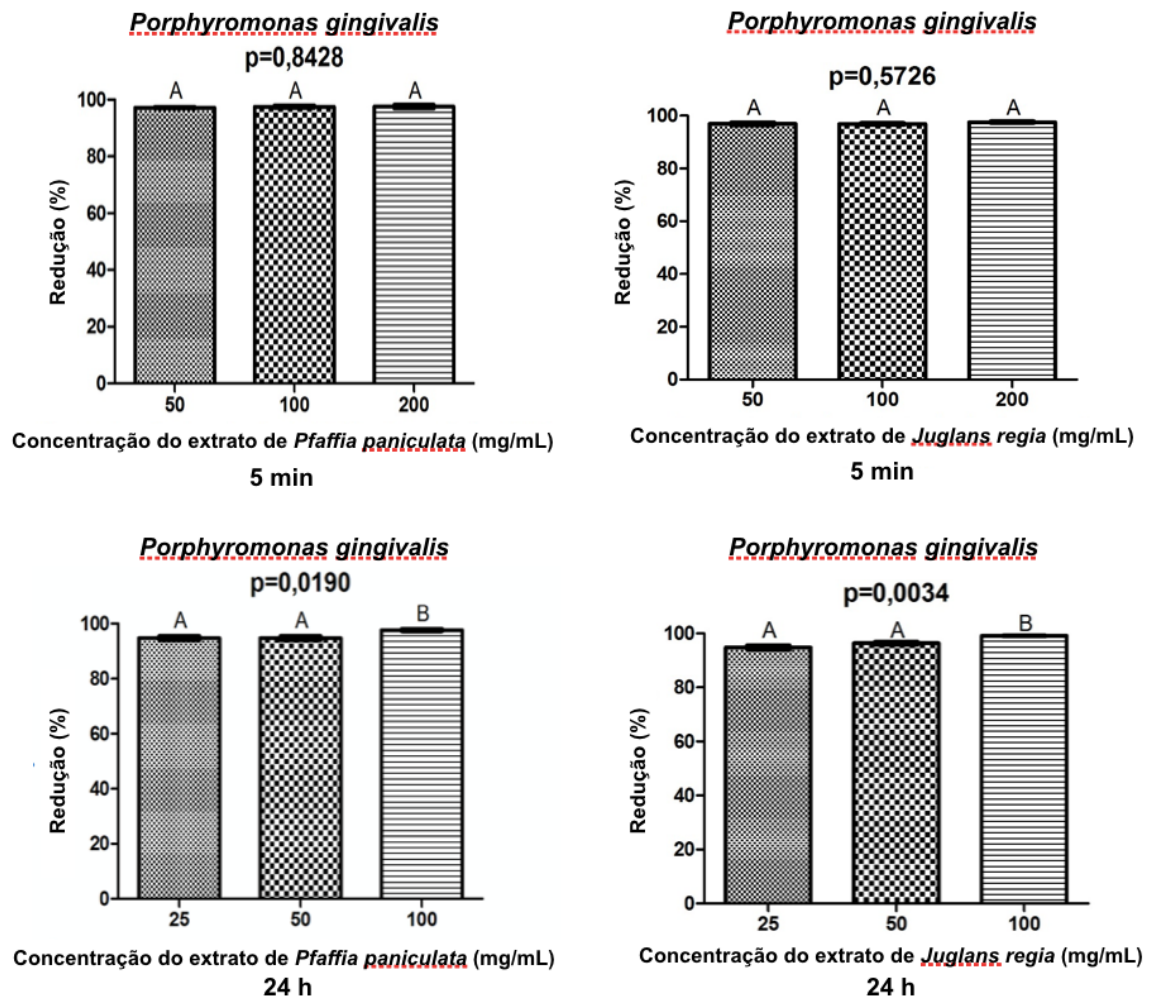
O extrato de *J. regia* também promoveu ação antimicrobiana frente as bactérias periodontopatogênicas, obtendo CMM de 50 mg/mL do extrato aplicado sobre *P. gingivalis*, *P. endodontalis*, *F. nucleatum* e *P. micra*.

4.1.1.2 Ação antibiofilme dos extratos de *P. paniculata* e *J. regia* sobre bactérias anaeróbias

O extrato de *P. paniculata* aplicado sobre o biofilme de *P. gingivalis* demonstrou ação antimicrobiana, onde as concentrações de 200, 100 e 50 mg/mL promoveram a erradicação total dos biofilmes, após 5 min. de contato. O extrato aplicado pelo tempo de 24 h também obteve ação antibiofilme, onde as concentrações de 25 e 50 mg/mL promoveram a redução de 96% do biofilme, enquanto a concentração de 100 mg/mL promoveu a erradicação total do mesmo (figura 4).

O extrato de *J. regia* demonstrou ação antimicrobiana promovendo a remoção total do biofilme de *P. gingivalis* após aplicação das concentrações de 200, 100 e 50 mg/mL por 5 min. A aplicação por 24 h das concentrações de 50 e 25 mg/mL resultou em redução de 96% do biofilme, enquanto a aplicação de 100 mg/mL promoveu a remoção total do biofilme.

Figura 4 - Ação antibiofilme dos extratos de *P. paniculata* e *J. regia* aplicado sobre *P. gingivalis* por 5 min. e 24 h



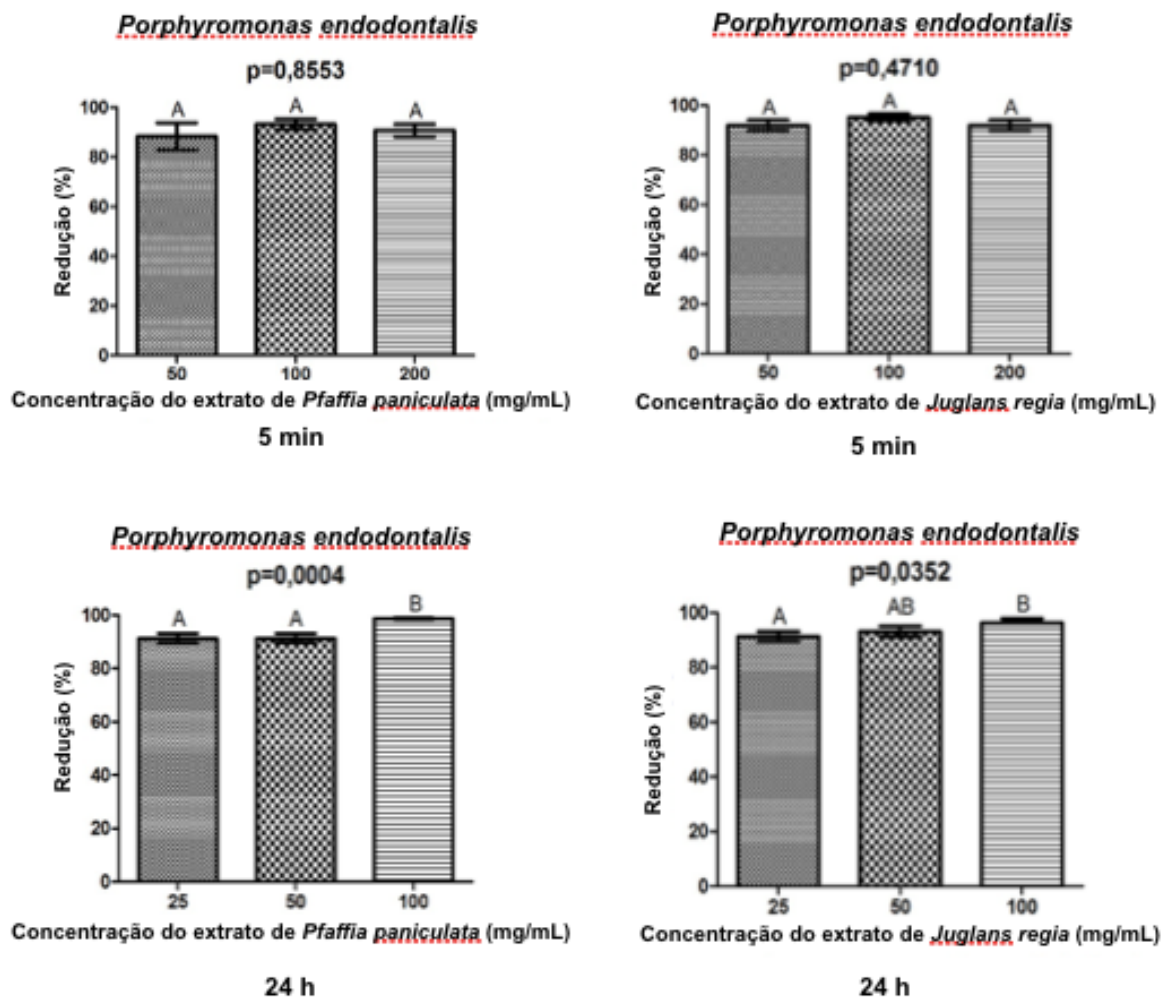
Fonte: Elaborado pelo próprio autor

A aplicação do extrato de *P. paniculata* sobre os biofilmes de *P. endodontalis* promoveu ação antimicrobiana para ambos os tempos de contato, onde a aplicação por 5 min. resultou em 87% de redução do biofilme com 50 mg/mL do extrato. As concentrações de 100 e 200 mg/mL promoveram respectivamente, as reduções de 90 e 89%. A aplicação do extrato por 24 h resultou em 90% de redução com as concentrações de 50 e 25 mg/mL, enquanto a concentração de 100 mg/mL resultou em erradicação total do biofilme (figura 5).

O extrato de *J. regia* promoveu ação antibiofilme sobre *P. endodontalis*, onde a aplicação por 5 min. resultou em reduções de 96 a 98% entre as concentrações de

50, 100 e 200 mg/mL. Já na aplicação por 24 h, o extrato nas concentrações de 25 e 50 mg/mL promoveram reduções de 90%, enquanto a concentração de 200 mg/mL promoveu a redução total do biofilme.

Figura 5 - Ação antibiofilme dos extratos de *P. paniculata* e *J. regia* aplicado sobre *P. endodontalis* por 5 min. e 24 h



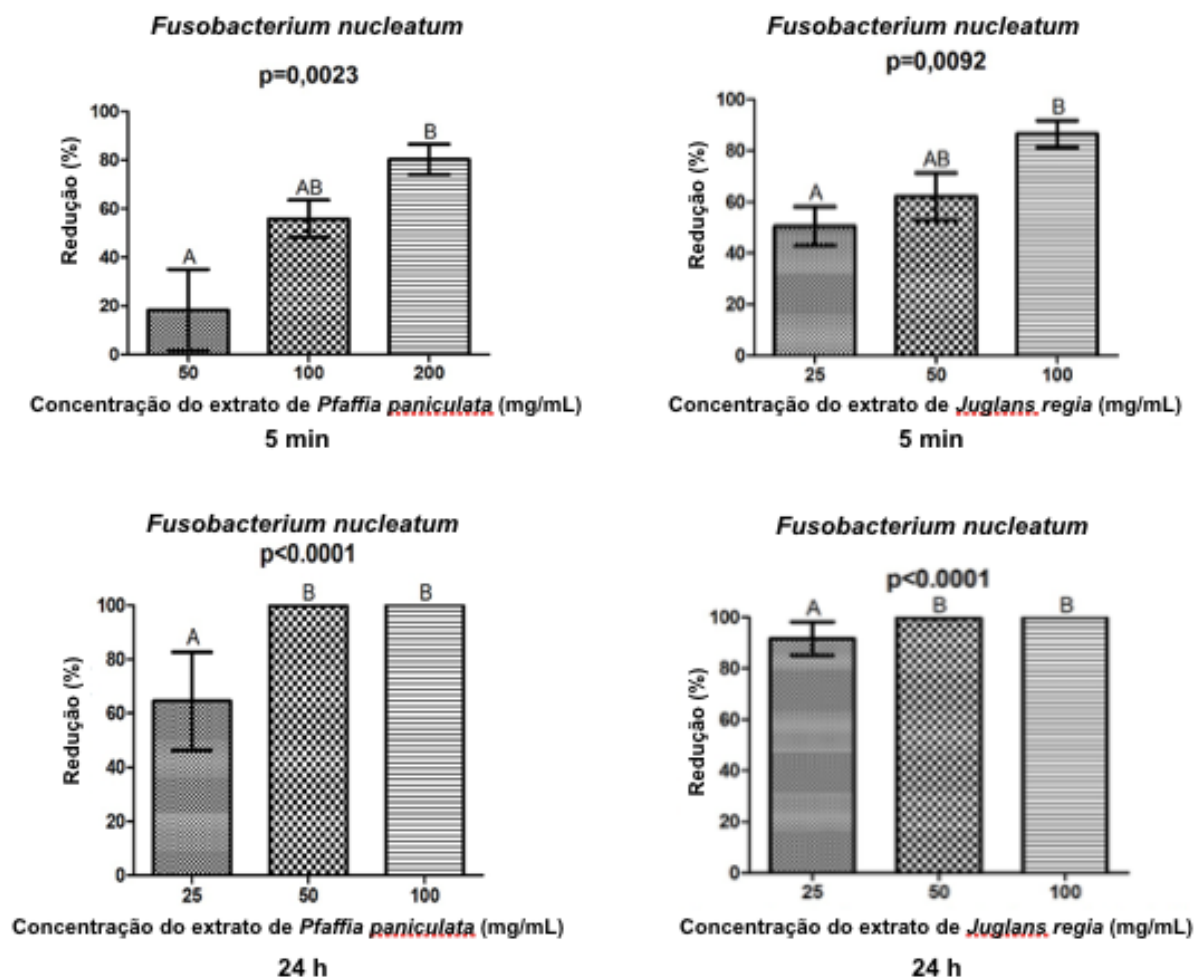
Fonte: Elaborado pelo próprio autor

O extrato de *P. paniculata* aplicado sobre o biofilme de *F. nucleatum* promoveu ação antimicrobiana, onde as concentrações de 50, 100 e 200 mg/mL promoveram a redução de 20, 60 e 80% respectivamente. Já a aplicação dos extratos

por 24 h resultaram em reduções de 65 e 100% após as concentrações de 25, 50 e 100 mg/mL.

O extrato de *J. regia* promoveu as reduções de 50, 60 e 90% após contato com as concentrações de 25, 50 e 100 mg/ml por 5 min. O extrato aplicado por 24 h promoveu uma redução de 90% do biofilme de *F. nucleatum* com a concentração de 25 mg/mL, enquanto as concentrações de 50 e 100 mg/mL promoveram a eliminação total do biofilme, como pode ser visto na figura 6.

Figura 6 - Ação antibiofilme dos extratos de *P. paniculata* e *J. regia* aplicado sobre *F. nucleatum* por 5 min. e 24 h

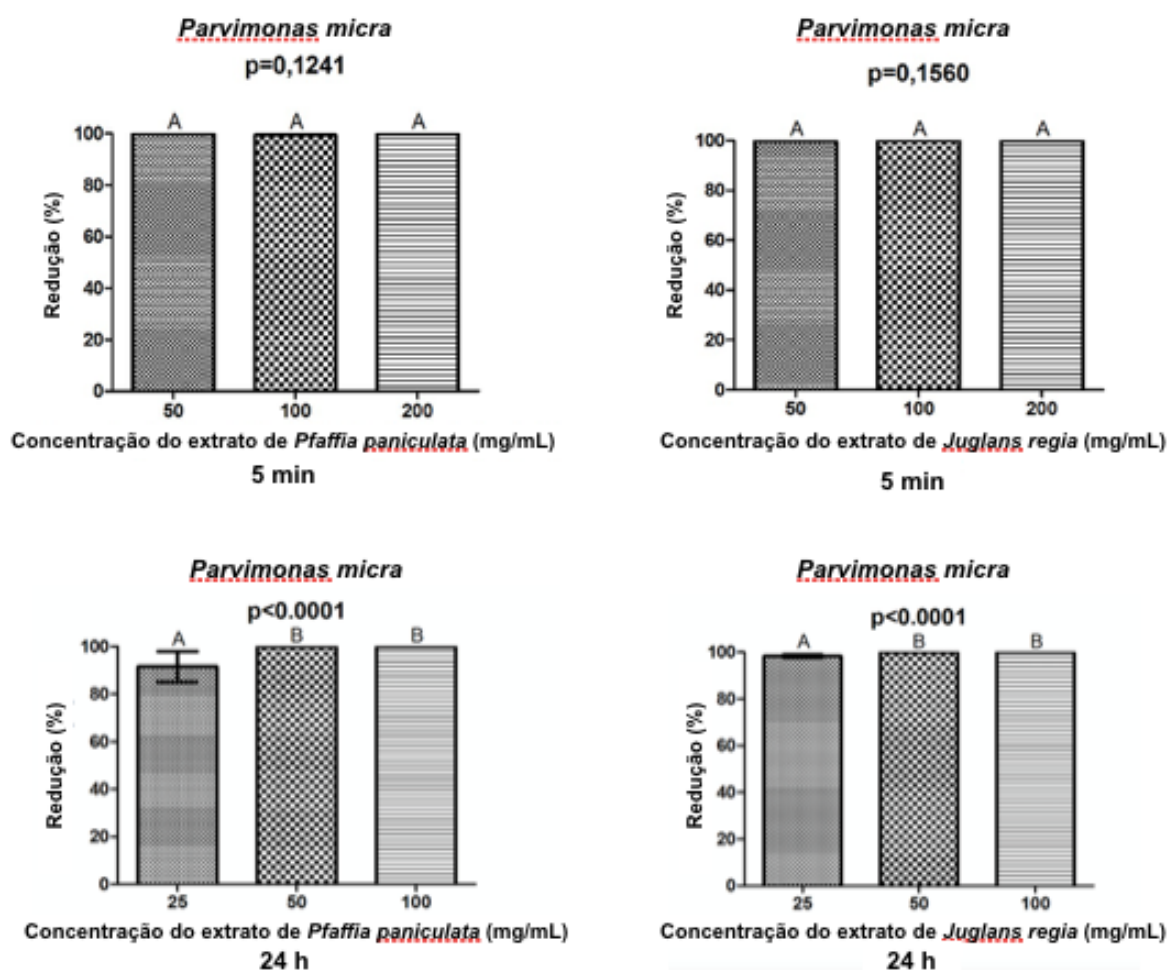


Fonte: Elaborado pelo próprio autor

O extrato de *P. paniculata* aplicado por 5 min. sobre o biofilme de *P. micra* promoveu a erradicação do biofilme em todas as concentrações testadas. A concentração de 25 mg/mL aplicada por 24 h promoveu a redução de 90% do biofilme de *P. micra*, enquanto as concentrações de 50 e 100 mg/mL promoveram a redução total do biofilme.

O extrato de *J. regia* aplicado pelo tempo de 5 min. e por 24 h, nas concentrações de 200, 100, 50 e 25 mg/mL, promoveu o extermínio total dos biofilmes de *P. micra*.

Figura 7 - Ação antibiofilme dos extratos de *P. paniculata* e *J. regia* aplicado sobre *P. micra* por 5 min. e 24 h



Fonte: Elaborado pelo próprio autor

4.1.2 Ação antimicrobiana dos extratos de *P. paniculata* e *J. regia* sobre Biofilmes Heterotípicos de micro-organismos aeróbios

O extrato de *P. paniculata* demonstrou ação antimicrobiana frente aos biofilmes heterotípicos de *C. albicans* associada a *S. mutans* promovendo reduções de 62,0 a 45,8% na biomassa do biofilme, ambas com significância estatística ($p < 0.05\%$), além de promover reduções de 71,1 a 1,13% na atividade metabólica dos micro-organismos, após contato por 5 min., conforme mostra a tabela 1. O extrato de *J. regia* promoveu reduções na biomassa do biofilme de 48,0%; 56,7% e 55,0% após contato com as concentrações de 200, 100 e 50 mg/mL pelo tempo de 5 min. A atividade metabólica do biofilme heterotípico também foi afetada pelo tratamento, onde a concentração de 200 mg/mL promoveu a redução de 79,0%, 100 mg/mL promoveu redução de 87,3% e por fim a concentração de 50 mg/mL promoveu a redução de 89,2%, ambas as reduções obtiveram diferença com significância estatística ($p < 0.05\%$) comparadas ao grupo controle de crescimento.

O extrato de *P. paniculata* aplicado pelo tempo de 24 h promoveu reduções na biomassa do biofilme com significância estatística ($p < 0.05\%$), onde as concentrações de 100, 50 e 25 mg/mL promoveram as reduções de 33,0%; 23,6% e 22,8%. Já a atividade metabólica do biofilme foi reduzida em 38,0%; 18,7% e 0,79% após contato com concentrações de 100, 50 e 25 mg/mL. O extrato de *J. regia* promoveu reduções na biomassa de 49,3% a 60,0%, enquanto a atividade metabólica do biofilme heterotípico de *C. albicans* e *S. mutans* obteve reduções de 66,0 a 61,7% após contato com as concentrações de 100, 50 e 25 mg/mL por 24 h.

Tabela 1 - Atividade antimicrobiana dos extratos de *J. regia* e *P. paniculata* sobre os biofilmes heterotípicos de *C. albicans* e *S. mutans*

<i>Candida albicans</i> + <i>Streptococcus mutans</i>										
5 min.						24 h				
[] do extrato (mg/mL)	CV		MTT		[] do extrato (mg/mL)	CV		MTT		[] do extrato (mg/mL)
	Redução (%)	Diferença estatística (p<0.05%)	Redução (%)	Diferença estatística (p<0.05%)		Redução (%)	Diferença estatística (p<0.05%)	Redução (%)	Diferença estatística (p<0.05%)	
<i>P. paniculata</i>	200 mg/mL	62,0%	B	71,1%	B	100 mg/mL	33,0%	B	38,0%	B
	100 mg/mL	52,7%	B	18,2%	C	50 mg/mL	23,6%	B	18,7%	C
	50 mg/mL	45,8%	B	1,13%	A	25 mg/mL	22,8%	B	0,79%	A
<i>J. regia</i>	200 mg/mL	48,0%	B	79,0%	B	100 mg/mL	49,3%	B	66,0%	B
	100 mg/mL	56,7%	C	87,3%	C	50 mg/mL	61,6%	C	62,3%	B
	50 mg/mL	55,0%	C	89,2%	C	25 mg/mL	60,0%	C	61,7%	B

Legenda: CV - Teste de Cristal violeta evidenciando a biomassa do biofilme; [] - Concentração do extrato em mg/mL aplicado sobre o biofilme; Letras (A, B e C) representam a diferença ou semelhança estatística (p<0.05%) entre os grupos ,considerando sempre o grupo controle como letra (A) obtendo 0% de redução.

Fonte: Elaborado pelo próprio autor

As concentrações de 200, 100 e 50 mg/mL do extrato de *P. paniculata* promoveram as reduções na biomassa do biofilme de *C. albicans* associada a *E. faecalis* de 23,8%; 11,3% e 3,4% após contato por 5 min. Já as reduções promovidas na atividade metabólica da estrutura foram de 17,6%; 6,6% e 6,9%. O extrato de *J. regia* promoveu reduções na biomassa de 40,7% a 31,2%, conforme demonstrado na tabela 2. Já a atividade metabólica do biofilme foi afetada em 54,4%; 28,6% e 3,9% após contato com as concentrações de 200, 100 e 50 mg/mL por 5 min.

O tempo de contato de 24 h com o extrato de *P. paniculata* promoveu reduções na biomassa de 42,0 % e 8,15% após as concentrações de 100 e 50 mg/mL. Já a concentração de 25 mg/mL não promoveu reduções na estrutura do biofilme. O mesmo se foi observado no teste de atividade metabólica onde somente as concentrações de 100 e 50 mg/mL promoveram reduções com valores de 42,1% e

37,8%. As concentrações de 100, 50 e 25 mg/mL do extrato de *J. regia* aplicadas por 24 h foram capazes de promover as reduções de 19,1%; 11,5% e 2,9% na biomassa do biofilme heterotípico de *C. albicans* e *E. faecalis*; Enquanto as reduções da atividade metabólica foram de 17,6%; 13,0% e 1,9%, conforme mostrado na tabela 2.

Tabela 2 - Atividade antimicrobiana dos extratos de *J. regia* e *P. paniculata* sobre os biofilmes heterotípicos de *C. albicans* e *E. faecalis*

<i>Candida albicans</i> + <i>Enterococcus faecalis</i>										
5 min.						24 h				
[] do extrato (mg/mL)	CV		MTT		[] do extrato (mg/mL)	CV		MTT		[] do extrato (mg/mL)
	Redução (%)	Diferença estatística (p<0.05%)	Redução (%)	Diferença estatística (p<0.05%)		Redução (%)	Diferença estatística (p<0.05%)	Redução (%)	Diferença estatística (p<0.05%)	
<i>P. paniculata</i>	200 mg/mL	23,8%	B	17,6%	B	100 mg/mL	42,0%	B	42,1%	B
	100 mg/mL	11,3%	A	6,6%	A	50 mg/mL	8,15%	A	37,8%	B
	50 mg/mL	3,4%	A	6,9%	A	25 mg/mL	+3,97%	A	+4,25%	C
<i>J. regia</i>	200 mg/mL	40,7%	B	54,4%	B	100 mg/mL	19,1%	B	17,6%	B
	100 mg/mL	33,9%	C	28,6%	C	50 mg/mL	11,5%	C	13,0%	B
	50 mg/mL	31,2%	C	3,9%	D	25 mg/mL	2,9%	A	1,9%	A

Legenda: CV – Teste de Cristal violeta evidenciando a biomassa do biofilme; [] : Concentração do extrato em mg/mL aplicado sobre o biofilme; Letras (A, B e C) representam a diferença ou semelhança estatística (p<0.05%) entre os grupos ,considerando sempre o grupo controle como letra (A) obtendo 0% de redução.

Fonte: Elaborado pelo próprio autor

O extrato de *P. paniculata* aplicado sobre o biofilme heterotípico de *C. albicans* e *S. aureus* pelo tempo de 5 min. promoveu reduções de 29,5 a 13,7% sobre a atividade metabólica dos micro-organismos após contato com as concentrações de 200, 100 e 50 mg/mL. Entretanto a biomassa do biofilme demonstrou redução apenas quando em contato com concentração de 200 mg/mL. O extrato de *J. regia* promoveu reduções na biomassa de 4,9% e 1,6% frente as concentrações de 200 e 100 mg/mL

após 5 min. de contato. Enquanto a atividade metabólica sofreu reduções de 15,8% e 3,9% frente as concentrações de 200 e 100 mg/mL.

Após contato por 24 h, o extrato de *P. paniculata* promoveu redução de 11,9% na biomassa do biofilme heterotípico e 23,0% de redução na atividade metabólica do mesmo. Já o extrato de *J. regia* obteve reduções na biomassa de 22,5% e 9,3% após contato com as concentrações de 100 e 50 mg/mL. A atividade metabólica do biofilme heterotípico obteve reduções de 38,3% e 25,0% frente as concentrações de 100 e 50 mg/mL, conforme mostra a tabela 3.

Tabela 3 - Atividade antimicrobiana dos extratos de *J. regia* e *P. paniculata* sobre os biofilmes heterotípicos de *C. albicans* e *S. aureus*

<i>Candida albicans</i> + <i>Staphylococcus aureus</i>										
5 min.						24 h				
[] do extrato (mg/mL)	CV		MTT		[] do extrato (mg/mL)	CV		MTT		
	Redução (%)	Diferença estatística (p<0.05%)	Redução (%)	Diferença estatística (p<0.05%)		Redução (%)	Diferença estatística (p<0.05%)	Redução (%)	Diferença estatística (p<0.05%)	
<i>P. paniculata</i>	200 mg/mL	1,8%	A	29,5%	B	100 mg/mL	11,9%	AB	23,0%	B
	100 mg/mL	+5,81%	A	6,13%	A	50 mg/mL	+5,63%	A	4,2%	A
	50 mg/mL	+27,0%	B	13,7%	A	25 mg/mL	+10,9%	A	+2,2%	A
<i>J. regia</i>	200 mg/mL	4,9%	A	15,8%	B	100 mg/mL	22,5%	B	38,3%	B
	100 mg/mL	1,6%	A	3,9%	A	50 mg/mL	9,3%	A	25,0%	C
	50 mg/mL	+5,4%	B	+1,3%	A	25 mg/mL	1,7%	A	6,0%	A

Legenda: CV – Teste de Cristal violeta, evidenciando a biomassa do biofilme; [] : Concentração do extrato em mg/mL aplicado sobre o biofilme; Letras (A, B e C) representam a diferença ou semelhança estatística (p<0.05%) entre os grupos, considerando sempre o grupo controle como letra (A) obtendo 0% de redução.

Fonte: Elaborado pelo próprio autor

P. paniculata promoveu reduções frente ao biofilme de *C. albicans* em associação com *P. aeruginosa*, onde a biomassa da estrutura foi reduzida em 6,5%

após a concentração de 200 mg/mL, enquanto a atividade metabólica obteve reduções de 20,9% e 19,8% após contato com 200 e 100 mg/mL do extrato. O extrato de *J. regia* promoveu reduções na biomassa do biofilme de 32,4%; 29,8% e 11,6% após as concentrações de 200, 100 e 50 mg/mL. Já a atividade metabólica do biofilme de *C. albicans* e *P. aeruginosa* obteve reduções de 79,5%; 67,3% e 60,2%.

O extrato de *P. paniculata* aplicado por 24 h sobre o biofilme heterotípico promoveu reduções na biomassa de 32,3% e 18,4%, enquanto a atividade metabólica sofreu reduções de 37,3% e 30,0% após as concentrações de 100 e 50 mg/mL. O extrato de *J. regia* promoveu reduções de 44,7% e 11,3% na biomassa do biofilme após contato por 24 h com as concentrações de 100 e 50 mg/mL; Já a atividade metabólica do biofilme de *C. albicans* e *P. aeruginosa* obteve reduções de 41,9% e 30,5%, conforme mostra a tabela 4.

Tabela 4 - Atividade antimicrobiana dos extratos de *J. regia* e *P. paniculata* sobre os biofilmes heterotípicos de *C. albicans* e *P. aeruginosa*

<i>Candida albicans</i> + <i>Pseudomonas aeruginosa</i>										
5 min.						24 h				
[] do extrato (mg/mL)	CV		MTT		[] do extrato (mg/mL)	CV		MTT		Diferença estatística (p<0.05%)
	Redução (%)	Diferença estatística (p<0.05%)	Redução (%)	Diferença estatística (p<0.05%)		Redução (%)	Diferença estatística (p<0.05%)	Redução (%)	Diferença estatística (p<0.05%)	
<i>P. paniculata</i>	200 mg/mL	6,5%	A	20,9%	B	100 mg/mL	32,2%	B	37,3%	B
	100 mg/mL	+9,3%	A	19,8%	B	50 mg/mL	18,4%	B	30,0%	C
	50 mg/mL	+20,4%	B	0,4%	C	25 mg/mL	+2,91%	A	7,06%	D
<i>J. regia</i>	200 mg/mL	32,4%	B	79,5%	B	100 mg/mL	44,7%	B	41,9%	B
	100 mg/mL	29,8%	B	67,3%	C	50 mg/mL	11,3%	C	30,5%	C
	50 mg/mL	11,6%	C	60,2%	C	25 mg/mL	+2,7%	A	0,9%	A

Legenda: CV – Teste de Cristal violeta, evidenciando a biomassa do biofilme; [] : Concentração do extrato em mg/mL aplicado sobre o biofilme; Letras (A, B e C) representam a diferença ou semelhança estatística (p<0.05%) entre os grupos ,considerando sempre o grupo controle como letra (A) obtendo 0% de redução.

Fonte: próprio autor

4.1.3 Avaliação da atividade antimicrobiana dos extratos de *P. paniculata* e *J. regia* sobre cepas de *Klebsiella pneumoniae* multirresistente

Os extratos de *P. paniculata* e *J. regia* demonstraram ação antimicrobiana sobre as cepas multirresistentes promovendo concentração inibitória mínima (CIM) frente a culturas planctônicas e reduções com significância estatística (p<0,05%) frente aos biofilmes monotípicos.

4.1.3.1 Atividade antimicrobiana dos extratos de *P. paniculata* e *J. regia* sobre culturas planctônicas

Os extratos promoveram ação bactericida e bacteriostática frente as cepas produtoras de carbapenemases, obtendo valores de CIM e CMM. As cepas 400381, 386546 e 367725 obtiveram concentração inibitória mínima (CIM) com 12,5 mg/mL, do extrato de *P. paniculata*, enquanto o extrato de *J. regia* promoveu CIM com 25 mg/mL, conforme demonstrado na tabela 5. A concentração microbicida (CMM) variou entre as cepas de *K. pneumoniae* onde o extrato de *P. paniculata* promoveu CMM com 50 mg/mL frente aos isolados 400381 e 367725, enquanto para a cepa 386546 a CMM foi obtida com 25 mg/mL. O extrato de *J. regia* obteve CMM com a concentração de 50 mg/mL frente todas as cepas.

Tabela 5 - Valores de CIM e CMM dos extratos de *P. paniculata* e *J. regia* frente aos isolados clínicos de *K. pneumoniae*

	<i>P. paniculata</i>		<i>J. regia</i>	
	CIM	CMM	CIM	CMM
400381	12,5 mg/mL	50 mg/mL	25 mg/mL	50 mg/mL
386546	12,5 mg/mL	25 mg/mL	25 mg/mL	50 mg/mL
367725	12,5 mg/mL	50 mg/mL	25 mg/mL	50 mg/mL

Legenda: CIM – Concentração inibitória mínima; CMM - Concentração microbicida mínima; Concentração do extrato em mg/mL,
Fonte: Elaborado pelo próprio autor

4.1.3.2 Atividade antimicrobiana dos extratos de *P. paniculata* e *J. regia* sobre biofilmes monotípicos de *K. pneumoniae* multirresistente

Os biofilmes derivados do isolado clínico 400381 foram sensíveis a aplicação do extrato de *P. paniculata*, exibindo reduções de 64,9% a 42,7% na biomassa do biofilme monotípico, enquanto o teste de atividade metabólica demonstrou reduções variando de 7,96% a 1,39%, conforme mostra a tabela 6. O extrato de *J. regia* promoveu as reduções na biomassa de 42,5%; 39,7% e 33,8% após contato com as concentrações de 100, 50 e 25 mg/mL. Já a atividade metabólica do isolado clínico obteve reduções de 52,1%; 34,6% e 21,1% frente as concentrações citadas acima.

Tabela 6 - Ação antibiofilme dos extratos de *P. paniculata* e *J. regia* frente ao isolado clínico de *K. pneumoniae* 400381

<i>Klebsiella pneumoniae</i> 400381					
5 min.					
[] do extrato (mg/mL)		CV		MTT	
		Redução (%)	Diferença estatística (p<0.05%)	Redução (%)	Diferença estatística (p<0.05%)
<i>P. paniculata</i>	100 mg/mL	64,9%	B	7,96%	A
	50 mg/mL	50,0%	BC	1,46%	A
	25 mg/mL	42,7%	C	1,39%	A
<i>J. regia</i>	100 mg/mL	42,5%	B	52,1%	B
	50 mg/mL	39,7%	B	34,6%	C
	25 mg/mL	33,8%	B	21,1%	D

Legenda: CV – Teste de Cristal violeta, evidenciando a biomassa do biofilme; [] : Concentração do extrato em mg/mL aplicado sobre o biofilme; Letras (A, B e C) representam a diferença ou semelhança estatística (p<0.05%) entre os grupos ,considerando sempre o grupo controle como letra (A) obtendo 0% de redução.

Fonte: Elaborado pelo próprio autor

O extrato de *P. paniculata* promoveu reduções de 24,9%; 17,9% e 11,5% após contato com as concentrações de 100, 50 e 25 mg/mL. A atividade metabólica do biofilme obteve reduções de 19,0% a 14,3%. O extrato de *J. regia* promoveu reduções de 10,5% a 4,4% na biomassa do isolado clínico, enquanto a atividade metabólica obteve reduções de 45,1% a 38,3%, conforme pode ser observado na tabela 7.

Tabela 7 - Ação antibiofilme dos extratos de *P. paniculata* e *J. regia* frente ao isolado clínico de *K. pneumoniae* 386546

<i>Klebsiella pneumoniae</i> 386546					
5 min.					
[] do extrato (mg/mL)		CV		MTT	
		Redução (%)	Diferença estatística (p<0.05%)	Redução (%)	Diferença estatística (p<0.05%)
<i>P. paniculata</i>	100 mg/mL	24,9%	B	19,0%	B
	50 mg/mL	17,9%	B	18,1%	B
	25 mg/mL	11,5%	A	14,3%	B
<i>J. regia</i>	100 mg/mL	10,5%	B	45,1%	B
	50 mg/mL	8,8%	A	44,3%	B
	25 mg/mL	4,4%	A	38,3%	C

Legenda: CV – Teste de Cristal violeta, evidenciando a biomassa do biofilme; [] : Concentração do extrato em mg/mL aplicado sobre o biofilme; Letras (A, B e C) representam a diferença ou semelhança estatística (p<0.05%) entre os grupos ,considerando sempre o grupo controle como letra (A) obtendo 0% de redução.

Fonte: Elaborado pelo próprio autor

O extrato de *P. paniculata* promoveu reduções de 27,4%; 16,0% e 12,6% sobre a biomassa do biofilme de *K. pneumoniae* (isolado 367725), após contato por 5 min. com as concentrações de 100, 50 e 25 mg/mL, conforme demonstra a tabela 8. A atividade metabólica do biofilme foi reduzida em 67,9%; 53,5% e 49,2%, ambas as reduções obtiveram diferença estatística (p<0.05%) comparadas ao grupo controle de crescimento. O extrato de *J. regia* promoveu reduções de 17,5% a 17,1% após contato por 5 min. com a biomassa do biofilme, enquanto a atividade metabólica obteve reduções de 66,4%; 50,9% e 33,3% após as concentrações de 100, 50 e 25 mg/mL.

Tabela 8 - Ação antibiofilme dos extratos de *P. paniculata* e *J. regia* frente ao isolado clínico de *K. pneumoniae* 367725

<i>Klebsiella pneumoniae</i> 367725					
5 min.					
[] do extrato (mg/mL)		CV		MTT	
		Redução (%)	Diferença estatística (p<0.05%)	Redução (%)	Diferença estatística (p<0.05%)
<i>P. paniculata</i>	100 mg/mL	27,4%	B	67,9%	B
	50 mg/mL	16,0%	B	53,5%	C
	25 mg/mL	12,6%	A	49,2%	C
<i>J. regia</i>	100 mg/mL	17,5%	B	66,4%	B
	50 mg/mL	18,0%	B	50,9%	C
	25 mg/mL	17,1%	B	33,3%	D

Legenda: CV – Teste de Cristal violeta, evidenciando a biomassa do biofilme; [] : Concentração do extrato em mg/mL aplicado sobre o biofilme; Letras (A, B e C) representam a diferença ou semelhança estatística (p<0.05%) entre os grupos ,considerando sempre o grupo controle como letra (A) obtendo 0% de redução.

Fonte: Elaborado pelo próprio autor

4.2 Avaliação da citotoxicidade dos extratos por meio do teste de MTT

4.2.1 Citotoxicidade sobre macrófagos de camundongo (RAW 264-7)

O extrato de *P. paniculata*, aplicado sobre os macrófagos de camundongo (RAW 264-7) pelo tempo de 5 min., promoveu a redução da viabilidade celular da linhagem, onde as maiores concentrações do extrato, 200 e 100 mg/mL obtiveram 10,2 e 8,6% de viabilidade. Porém ao promover a diluição do extrato, o mesmo obteve melhores percentuais de viabilidade, com 50,1 e 45,9% de viabilidade após contato com as concentrações de 0,78 e 0,39 mg/mL, conforme mostra a tabela 9.

Tabela 9 - Viabilidade celular de macrófagos de camundongo (RAW 264-7) após contato por 5 min. e 24 h com os extratos glicólicos de *Pfaffia paniculata* K. e *Juglans regia* L

RAW 264-7									
5 min.					24 h				
[] do extrato (mg/mL)	<i>Pfaffia paniculata</i> K.		<i>Juglans regia</i> L.		[] do extrato (mg/mL)	<i>Pfaffia paniculata</i> K.		<i>Juglans regia</i> L.	
	Viabilidade celular (%)	Diferença estatística (p<0.05%)	Viabilidade celular (%)	Diferença estatística (p<0.05%)		Viabilidade celular (%)	Diferença estatística (p<0.05%)	Viabilidade celular (%)	Diferença estatística (p<0.05%)
200 mg/mL	10,2%	B	36,1%	B	150 mg/mL	24,1%	B	84,5%	B
100 mg/mL	8,6%	B	43,2%	B	100 mg/mL	18,1%	B	86,5%	B
50 mg/mL	24,5%	C	45,1%	B	50 mg/mL	26,5%	B	56,8%	C
25 mg/mL	13,9%	B	35,6%	B	25 mg/mL	44,3%	C	37,3%	D
12,5 mg/mL	15,1%	B	58,0%	BC	12,5 mg/mL	47,4%	C	32,0%	D
6,25 mg/mL	31,8%	C	58,5%	BC	6,25 mg/mL	56,1%	CD	61,6%	C
3,12 mg/mL	30,7%	C	40,9%	B	3,12 mg/mL	62,2%	CD	73,8%	E
1,56 mg/mL	39,7%	C	46,8%	B	1,56 mg/mL	66,0%	CD	66,0%	BE
0,78 mg/mL	50,1%	D	60,2%	BC	0,78 mg/mL	88,8%	D	84,6%	A
0,39 mg/mL	45,9%	CD	114,2%	A	0,39 mg/mL	101,9%	A	113,5%	F
Clorex. 0,12%	20,9%	C	20,9%	C	Clorex. 0,06%	32,0%	B	32,0%	D

Legenda: [] : Concentração do extrato em mg/mL; Clorex 0,12%: Solução de digluconato de clorexidina a 0,12%; Clorex 0,06%: Solução de digluconato de clorexidina a 0,06%; Letras (B,C,D) representam a diferença ou semelhança estatística entre os grupos ,considerando sempre o grupo controle (-) como letra A obtendo 100% de Viabilidade.

Fonte: Elaborado pelo próprio autor

A aplicação de *P. paniculata* por 24 h obteve maiores percentuais de viabilidade celular, onde a concentração de 6,25 mg/mL obteve 56,1% de viabilidade celular, enquanto as concentrações de 3,12; 1,56; 0,78 e 0,39 mg/mL obtiveram os percentuais de 62,2; 66,0; 88,8 e 101,9%.

O extrato de *J. regia* aplicado por 5 min. sobre os macrófagos de camundongo resultou em 58% de viabilidade, com a concentração de 12,5 mg/mL. Já o tratamento por 24 h, com as concentrações de 25 e 12 mg/mL obtiveram 37,3 e 32,0% de

viabilidade celular, enquanto as concentrações de 150, 100 e 50 mg/mL obtiveram respectivamente 84,5; 86,5 e 56,8% de viabilidade celular.

4.2.2 Citotoxicidade sobre queratinócitos humanos (HaCat)

O extrato de *P. paniculata* aplicado por 5 min sobre os Queratinócitos humanos (HaCat) promoveu a viabilidade celular de 54,4; 65,5; 57,3 e 55,0% após contato com as concentrações de 25; 12,5; 6,25 e 3,12 mg/mL. As concentrações de 12,5; 6,25; 3,12; 0,78 e 0,39 mg/mL após o tempo de aplicação de 24 h, obtiveram os percentuais de viabilidade de 61,1; 59,1; 104,7; 87,4; 108,2 e 133,8% (Tabela 11).

O extrato de *J. regia* nas concentrações de 200; 100; 50 e 25 mg/mL obteve 56,0; 61,2; 92,5 e 92,3% de viabilidade celular. A aplicação do extrato pelo tempo de 24 h promoveu a viabilidade celular de 68,8; 59,2; 85,6 e 113,3% após contato com as concentrações de 25; 12,5; 6,25 e 3,12 mg/mL. Todas as concentrações testadas do extrato de *J. regia* se mostraram superiores em viabilidade celular quando comparadas a aplicação da Clorexidina, resultado este que também pode ser observado na análise estatística, onde o grupo da clorexidina difere de todos as concentrações testadas do extrato de *J. regia*.

Tabela 10 - Viabilidade celular de queratinócitos humanos (HaCat) após contato por 5 min. e 24 h com os extratos glicólicos de *Pfaffia paniculata* K. e *Juglans regia* L.

HaCat									
5 min.					24 h				
[] do extrato (mg/mL)	<i>Pfaffia paniculata</i> K.		<i>Juglans regia</i> L.		[] do extrato (mg/mL)	<i>Pfaffia paniculata</i> K.		<i>Juglans regia</i> L.	
	Viabilidade celular (%)	Diferença estatística (p<0.05%)	Viabilidade celular (%)	Diferença estatística (p<0.05%)		Viabilidade celular (%)	Diferença estatística (p<0.05%)	Viabilidade celular (%)	Diferença estatística (p<0.05%)
200 mg/mL	20,4%	B	56,0%	B	150 mg/mL	29,5%	B	57,2%	B
100 mg/mL	14,3%	B	61,2%	B	100 mg/mL	26,6%	B	46,5%	B
50 mg/mL	20,0%	B	92,5%	A	50 mg/mL	29,6%	B	43,9%	B
25 mg/mL	54,4%	C	92,3%	A	25 mg/mL	37,9%	B	68,8%	AB
12,5 mg/mL	65,5%	C	71,6%	B	12,5 mg/mL	61,1%	BC	59,2%	B
6,25 mg/mL	57,3%	C	69,4%	B	6,25 mg/mL	59,1%	BC	85,6%	A
3,12 mg/mL	55,0%	C	68,8%	C	3,12 mg/mL	104,7%	A	113,3%	A
1,56 mg/mL	44,5%	C	70,6%	B	1,56 mg/mL	87,4%	A	92,5%	A
0,78 mg/mL	52,8%	C	71,1%	B	0,78 mg/mL	108,2%	A	89,2%	A
0,39 mg/mL	41,4%	C	63,1%	B	0,39 mg/mL	133,8%	AD	128,4%	A
Clorex. 0,12%	18,7%	B	18,7%	D	Clorex. 0,06%	39,2%	B	39,2%	C

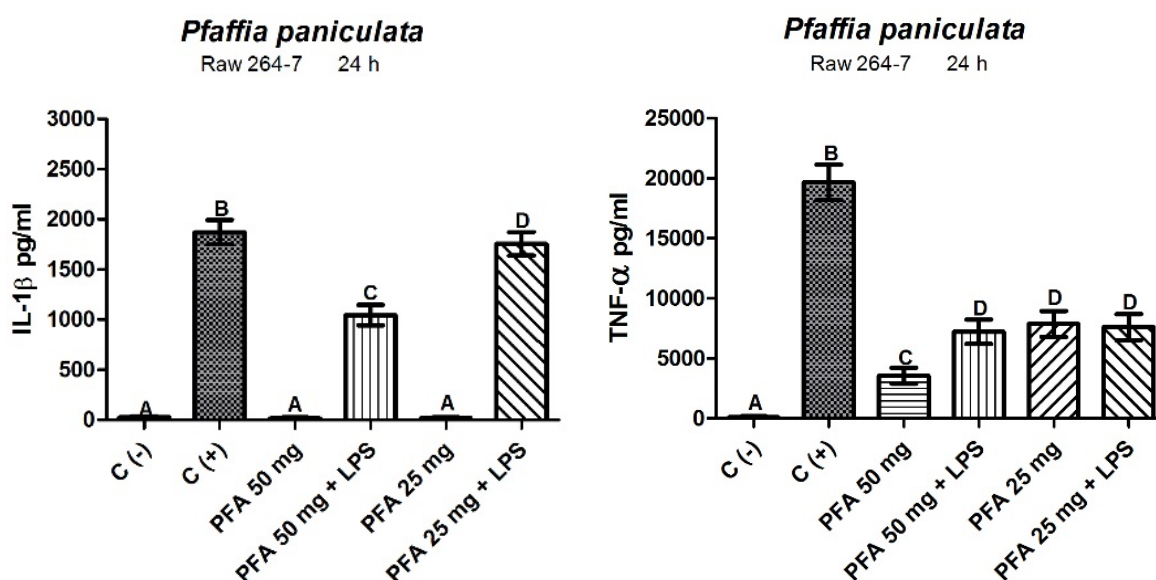
Legenda: Clorex 0,12%: Solução de digluconato de clorexidina a 0,12%; Clorex 0,06%: Solução de digluconato de clorexidina a 0,06%; Letras (B,C,D) representam a diferença ou semelhança estatística entre os grupos ,considerando sempre o grupo controle (-) como letra A obtendo 100% de Viabilidade.
Fonte: Elaborado pelo próprio autor

4.3 Ação anti-inflamatória dos extratos de *P. paniculata* e *J. regia* sobre macrófagos de camundongos (RAW 264-7)

O extrato de *P. paniculata* reduziu a produção da citocina pró-inflamatória IL-1 β , onde o grupo estimulado por LPS e tratado com 25 mg/mL do extrato obteve uma redução de 6,14% na síntese desta citocina, enquanto a concentração de 50 mg/mL promoveu a redução de 44,2%, ambas as reduções obtiveram significância ($p < 0,05\%$) estatística comparadas ao grupo controle (+) tratado com LPS.

O extrato de *P. paniculata* não promoveu a redução da citocina TNF- α com significância estatística ($P > 0,05\%$), uma vez que os grupos que contaram somente com as concentrações de 50 e 25 mg/mL do extrato exibiram a produção de TNF- α semelhantes aos grupos que receberam as concentrações do extrato associado ao LPS, conforme demonstrado na figura 8.

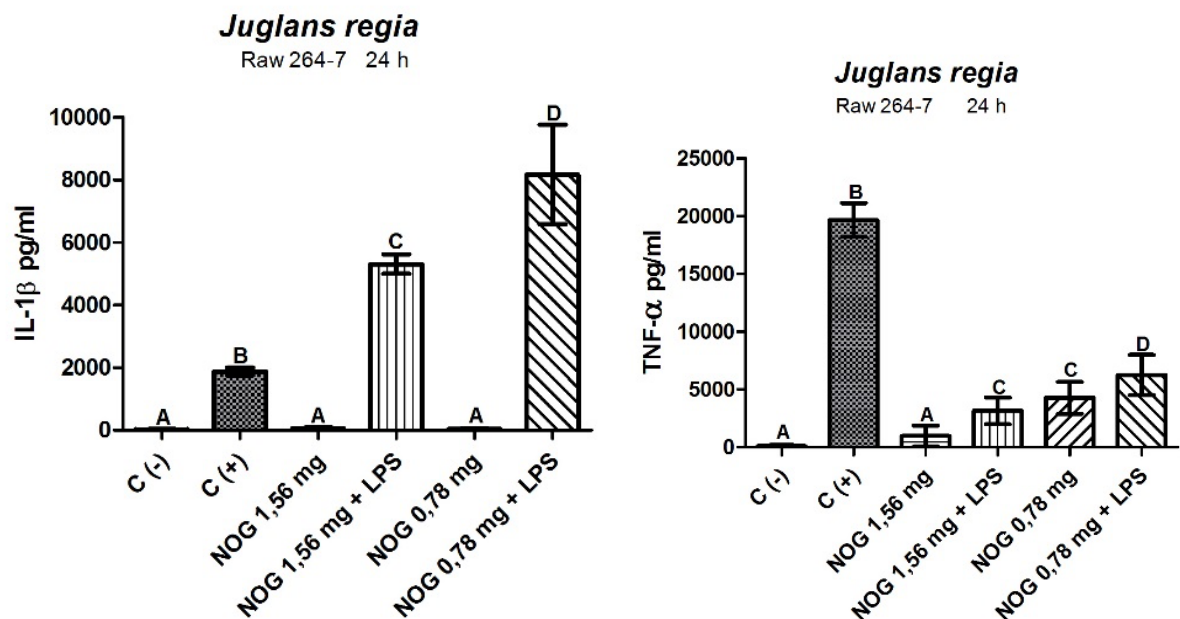
Figura 8 - Quantificação das citocinas pró-inflamatórias IL-1 β e TNF- α após contato com o extrato de *P. paniculata*



Fonte: Elaborado pelo próprio autor

O extrato de *J. regia* promoveu o aumento com significância estatística ($p<0,05\%$) na produção da citocina pró-inflamatória IL-1 β , sobre o grupo do extrato associado LPS, conforme mostra a figura 9. Porém os níveis de TNF- α foram reduzidos após contato com o extrato de *J. regia*, onde o grupo de 1,56 mg do extrato associado ao LPS obteve 84,0% de redução na produção de TNF- α e o grupo com a concentração de 0,78 mg/mL obteve a redução de 68,2%, ambos promoveram a redução da citocina pró-inflamatória TNF- α com significância estatística ($p<0,05\%$), conforme mostra a figura Figura 9.

Figura 9 - Quantificação das citocinas pró-inflamatórias IL-1 β e TNF- α após contato com o extrato de *J. regia*



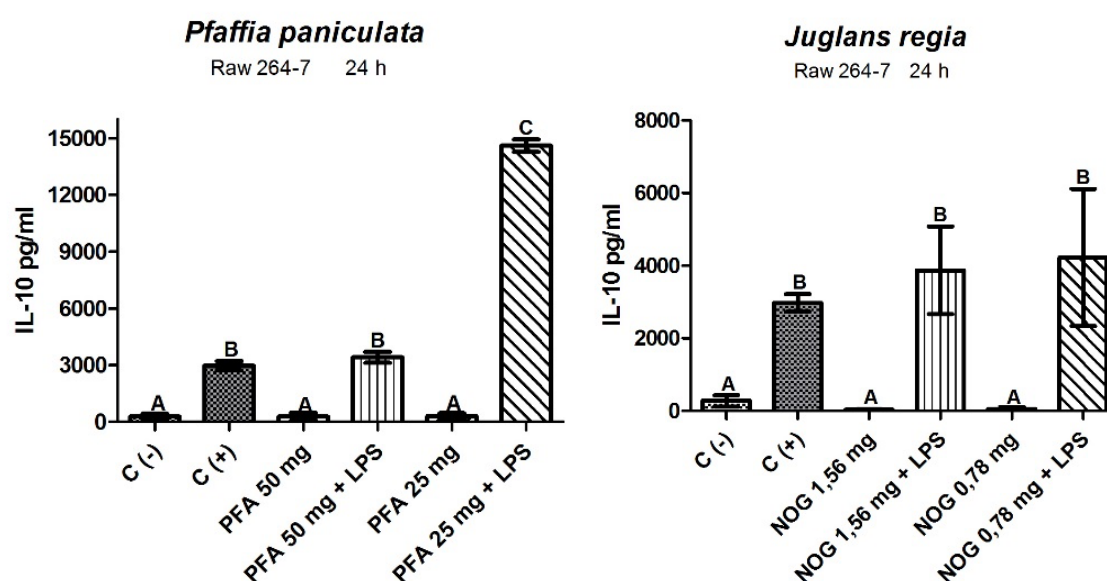
Fonte: Elaborado pelo próprio autor

O extrato de *P. paniculata* promoveu o aumento da concentração da citocina anti-inflamatória IL-10, onde a concentração de 25 mg/mL promoveu o aumento de 393% na produção da citocina, demonstrando diferença estatística em comparação ao grupo controle de crescimento ($p<0,0\%$). Já a concentração de 50 mg/mL promoveu

um aumento de 14,8%, não diferindo estatisticamente ($p>0,05\%$) do grupo controle, conforme mostra a figura 10.

O extrato de *J. regia* obteve semelhança estatística, na produção da citocina pró-inflamatória IL-10, comparado ao grupo controle (+).

Figura 10 - Quantificação da citocina anti-inflamatória IL-10 após contato com o extrato de *P. paniculata* e *J. regia*



Fonte: Elaborado pelo próprio autor

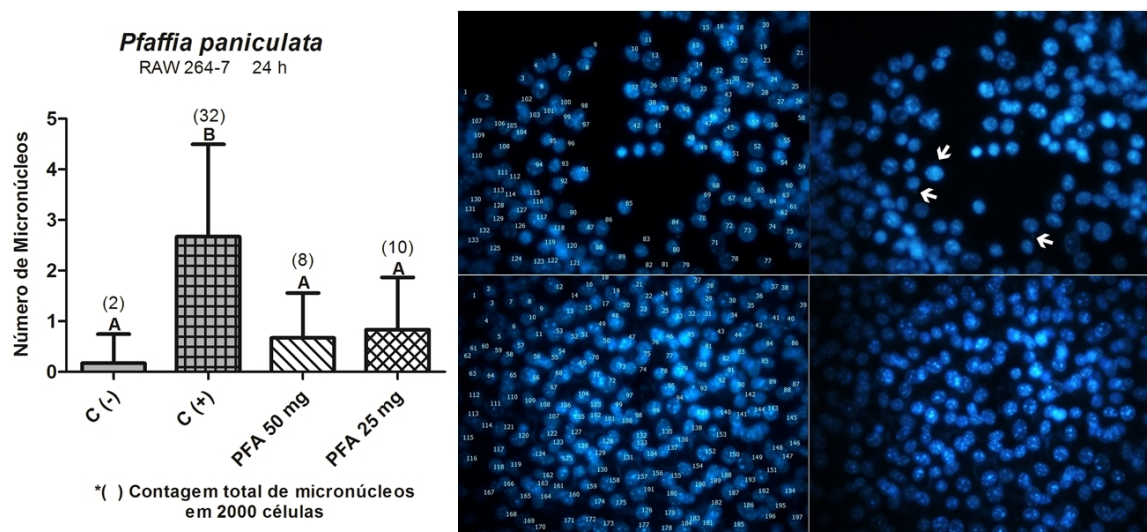
4.4 Genotoxicidade dos extratos

4.4.1 Avaliação da genotoxicidade do extrato de *P. paniculata* e *J. regia*

Após 24 h de contato com a cultura de macrófagos de camundongo (Raw 264-7) os grupos com as concentrações de 50 e 25 mg/mL do extrato de *P. paniculata*, apresentaram a formação de 8 e 10 micronúcleos, respectivamente, em uma contagem total de 2000 células. Ambos os grupos tratados com *P. paniculata*

apresentaram semelhança estatística ($p>0,05\%$) frente ao grupo controle (-), o qual esteve em contato apenas com o meio de cultivo celular (DMEM+ 10% SFB) e diferiram do grupo controle (+), o qual recebeu a aplicação de uma substância genotóxica (EMS), o resultado pode ser observado na figura 11.

Figura 11 - Contagem de micronúcleos em macrófagos de camundongo (RAW 264-7) após contato por 24 h com o extrato de *P. paniculata*

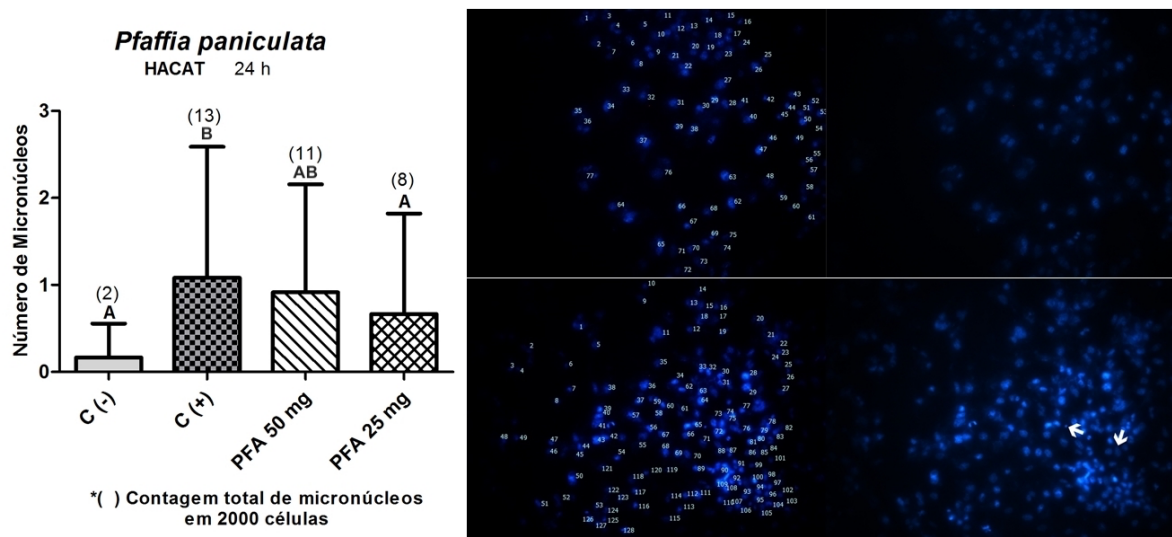


Legenda: C(-) Grupo controle negativo o qual recebeu a aplicação apenas do meio de cultivo DMEM suplementado com 10% de soro fetal bovino; C(+) Grupo controle positivo o qual recebeu a aplicação de etilmetano sulfanato, substância genotóxica; PFA 50 mg – aplicação do extrato de *P. paniculata* na concentração de 50 mg/mL; PFA 25 mg – aplicação do extrato de *P. paniculata* na concentração de 25 mg/mL; Setas presentes na imagem indicam a presença de micronúcleos.

Fonte: Elaborado pelo próprio autor

A aplicação do extrato de *P. paniculata* nas concentrações de 50 e 25 mg/mL pelo tempo de 24 h sobre Queratinócitos Humanos (HaCat) resultou na formação de 11 e 8 micronúcleos numa contagem total de 2000 células. A análise estatística demonstra que a concentração de 25 mg/mL apresenta similaridade estatística ao grupo controle (-), conforme demonstra a figura 12.

Figura 12 - Contagem de micronúcleos em Queratinócitos humanos (HaCat) após contato por 24 h com o extrato de *P. paniculata*

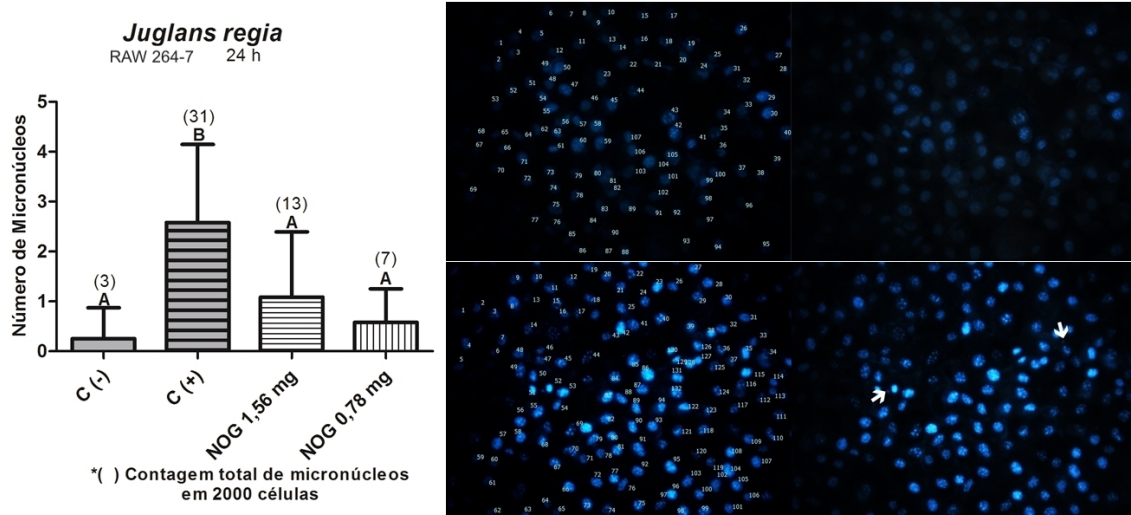


Legenda: C(-) Grupo controle negativo o qual recebeu a aplicação apenas do meio de cultivo DMEM suplementado com 10% de soro fetal bovino; C(+) Grupo controle positivo o qual recebeu a aplicação de etilmetano sulfonato, substância genotóxica; PFA 50 mg – aplicação do extrato de *P. paniculata* na concentração de 50 mg/mL; PFA 25 mg – aplicação do extrato de *P. paniculata* na concentração de 25 mg/mL; Setas presentes na imagem indicam a presença de micronúcleos.

Fonte: Elaborado pelo próprio autor

A aplicação do extrato de *J. regia* sobre macrófagos de camundongo (RAW 264-7) promoveu a formação de 13 e 7 micronúcleos em uma contagem total de 2000 células, após contato com as concentrações de 1,56 e 0,78 mg/mL. Os grupos que receberam a aplicação do extrato obtiveram semelhança estatística ($p > 0,05\%$) com o grupo controle (-), o qual recebeu apenas a aplicação do meio de cultivo celular, dados esses que podem ser observado na figura 13.

Figura 13 - Contagem de micronúcleos em Macrófagos de camundongo (RAW 264-7) após contato por 24 h com o extrato de *J. regia*

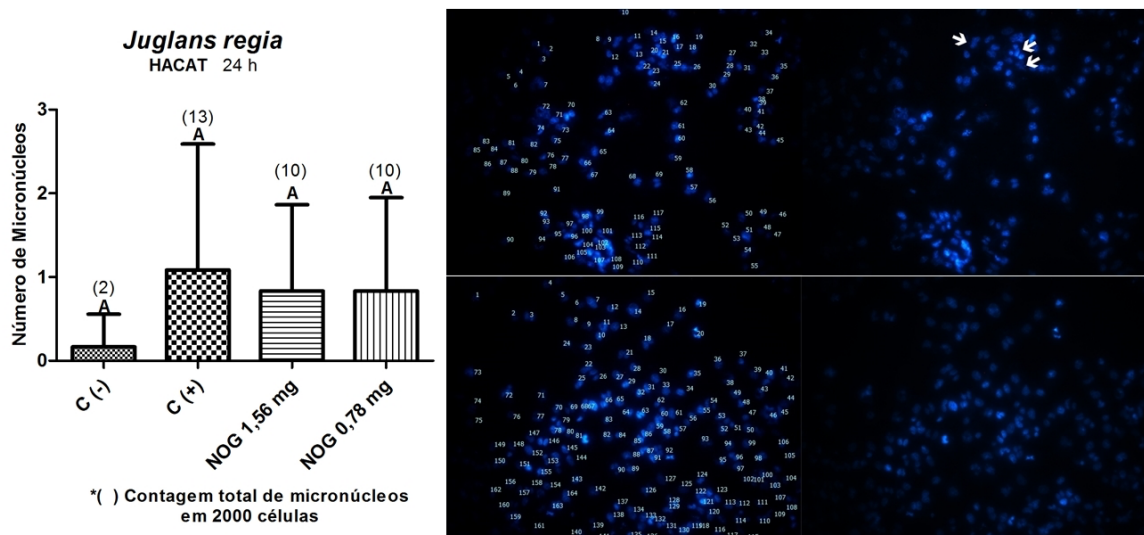


Legenda: C(-) Grupo controle negativo o qual recebeu a aplicação apenas do meio de cultivo DMEM suplementado com 10% de soro fetal bovino; C(+) Grupo controle positivo o qual recebeu a aplicação de etilmetano sulfonato, substância genotóxica; NOG 1,56 mg – aplicação do extrato de *J. regia* na concentração de 1,56 mg/mL; NOG 0,78 mg – aplicação do extrato de *J. regia* na concentração de 0,78 mg/mL; Setas presentes na imagem indicam a presença de micronúcleos.

Fonte: Elaborado pelo próprio autor

A aplicação do extrato de *J. regia* sobre Queratinócitos humanos (HaCat) promoveu a formação de 10 micronúcleos para ambas as concentrações testadas, conforme pode ser visualizado na figura 14. Os grupos não obtiveram diferença estatística ($p > 0,05\%$) quando comparados entre si.

Figura 14 - Contagem de micronúcleos em Queratinócitos humanos (HaCat) após contato por 24 h com o extrato de *J. regia*



Legenda: C(-) Grupo controle negativo o qual recebeu a aplicação apenas do meio de cultivo DMEM suplementado com 10% de soro fetal bovino; C(+) Grupo controle positivo o qual recebeu a aplicação de etilmetano sulfonato, substância genotóxica; NOG 1,56 mg – aplicação do extrato de *J. regia* na concentração de 1,56 mg/mL; NOG 0,78 mg – aplicação do extrato de *J. regia* na concentração de 0,78 mg/mL; Setas presentes na imagem indicam a presença de micronúcleos.

Fonte: Elaborado pelo próprio autor

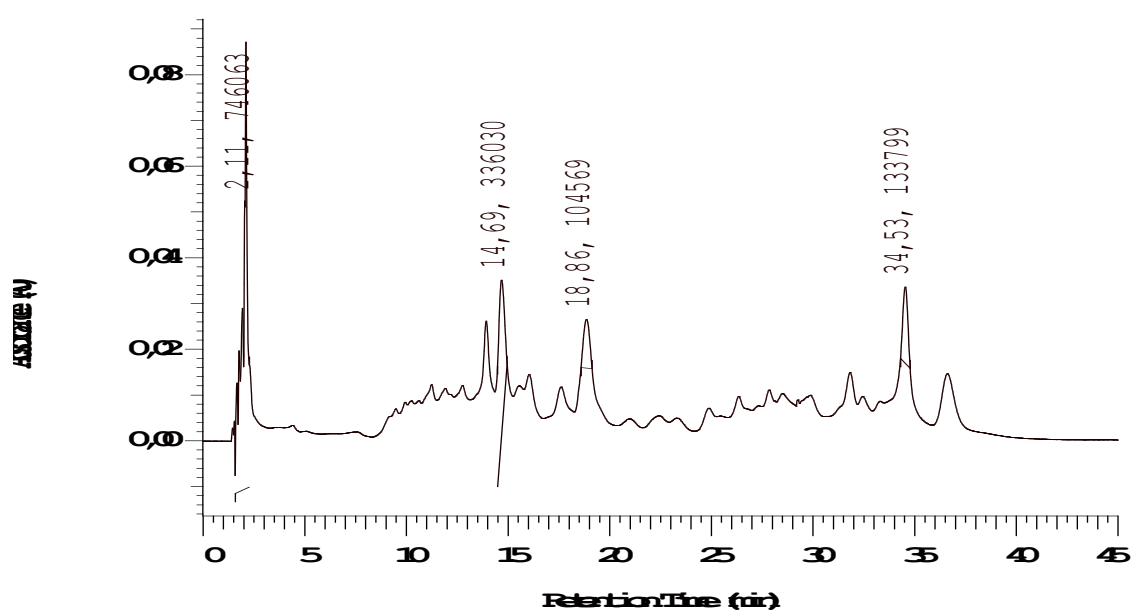
4.5 Atividade antioxidante dos extratos

O extrato de *J. regia* promoveu a CE_{50} , ou seja eliminando 50% dos radicais livres no reagente, com 37,26 $\mu\text{g/mL}$. Para *P. paniculata* a CE_{50} foi com 1367,57 $\mu\text{g/mL}$.

4.6 Análise Fitoquímica dos extratos

A análise por cromatografia identificou a presença de alguns derivados da benzofenona em tempo de retenção (tR) de 9,00; 17,40 e 18,86 min. no extrato glicólico de *P. paniculata*, conforme demonstra a figura 15.

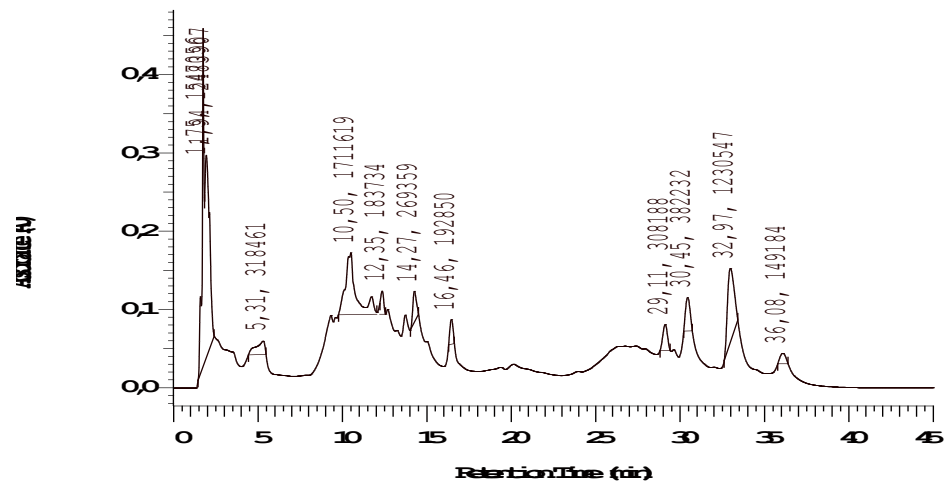
Figura 15 - Análise cromatográfica do extrato glicólico de *P. paniculata*



Fonte: Elaborado pelo próprio autor

A análise realizada sobre o extrato glicólico de *J. regia* demonstrou a presença ácido cafeoilquínico (derivado do ácido cafeico) em tempo de retenção (tR) de 32,97 min., conforme demonstrado na figura 16.

Figura 16 - Análise cromatográfica do extrato glicólico de *J. regia*



Fonte: Elaborado pelo próprio autor

5 DISCUSSÃO

A busca por elucidar as atividades biológicas que plantas e raízes tem crescido exponencialmente, uma vez que as problemáticas em saúde também tem se elevado de forma abrupta. A resistência microbiana frente a fármacos antibióticos e antifúngicos é uma das problemáticas de maior impacto já que os números de morbidade e mortalidade se elevam de forma exponencial e os tratamentos disponíveis para o combate desses patógenos se tornam cada vez mais escassos. Assim o presente trabalho buscou avaliar a atividade biológica dos extratos glicólicos de *P. paniculata* e *J. regia*, o qual apresentam poucas propriedades biológicas elucidadas (Abe et al., 2018; Yonath et al., 2019).

Os extratos de *P. paniculata* e *J. regia* demonstraram importante ação antimicrobiana frente as bactérias anaeróbias, exibindo valores de CMM sobre culturas planctônicas dos 4 micro-organismos testados, além de promover a eliminação do biofilme de *P. gingivalis*, *P. endodontalis* e *P. micra* utilizando os tempos de contato de 5 min. e 24 h. Estudos relacionando o uso de fitoterápicos sobre anaeróbios são escassos, uma vez que o próprio cultivo destes micro-organismos é dispendioso, assim os dados obtidos com o extrato de *P. paniculata* e *J. regia* são pioneiros até o presente momento (Fev/2020), não encontrando nenhum estudo prévio publicado na literatura consultada. Porém, algumas outras espécies vegetais já tiveram seu potencial biológico explorado como exemplo o trabalho de Hickl et al. (2018), que avaliaram a ação de algumas ervas mediterrâneas como *Cistus creticus*, *Cistus monspeliensis*, *Origanum vulgare*, *Rosmarinus officinalis*, *Salvia sclarea* e *Thymus longicaulis* sobre as cepas de *P. gingivalis* (W381), *F. nucleatum* (ATCC 25586) e *P. micra* (ATCC 23195). Neste estudo os resultados indicam que a CIM dos extratos variou em um limiar de 0,15 mg/mL a 0,60 mg/mL, enquanto a CMM foi obtida com concentrações variando de 0,15 mg/mL a 1,25 mg/mL, sendo empregado a utilização de extratos metanólicos. Os valores de CIM e CMM demonstrados no estudo de Hickl et al. (2018) demonstram concentrações extremamente baixas comparadas aos valores do presente estudo, no qual a CMM foi obtida com 50 mg/mL frente as espécies microbianas, para ambos os extratos. A diferença entre as concentrações variantes muito provavelmente está relacionada ao tipo de extrato

utilizado, uma vez que Hickl et al. (2018) utilizaram extratos metanólicos, o qual frequentemente apresentam maior atividade antimicrobiana devido ao álcool metílico, porém também apresentam maior toxicidade celular frente as células animais, enquanto o presente estudo fez a utilização de extratos formulados em propilenoglicol. Outro ponto importante a se ressaltar no comparativo entre os estudos está na utilização das cepas anaeróbias o qual ambos os estudos utilizaram cepas microbiológicas semelhantes, variando apenas a cepa de *P. micra* o qual apresenta outro registro (ATCC) e portanto outro perfil genético (Mohieldin et al. 2017).

Ainda em comparação ao estudo de Hickl et al. (2018) é possível notar que a cepa de *F. nucleatum* obteve uma maior resistência frente aos extratos aplicados pelos pesquisadores, onde o mesmo apresentou CMM com as concentrações mais elevadas, variando de 0,60 a 1,25 mg/mL. No presente estudo, a resistência de *F. nucleatum* foi observada na condição de biofilme onde as concentrações mais baixas aplicadas do extrato de *P. paniculata* e *J. regia* demonstram reduções variantes de 20 a 80%, não promovendo a erradicação completa do biofilme.

Os resultados obtidos frente aos micro-organismos anaeróbios são de grande relevância clínica pois a doença periodontal apresenta elevada incidência global, atingindo cerca de 50% da população mundial, com altos índices de morbidade devido a perda da inserção óssea dos dentes. Além de toda a problemática bucal que estes patógenos causam, estudos recentes relacionam a presença desses micro-organismos com o desenvolvimento de doenças como o Alzheimer e a artrite reumatóide. No que diz respeito ao Alzheimer, pesquisas a partir do ano de 2015 começaram a correlacionar a presença do patógeno bucal com a patologia neuronal, demonstrando que muitas enzimas produzidas no sítio bucal por *P. gingivalis* atuam como agressoras das células neuronais. Essas proteínas são denominadas *Gigipains* e ajudam na evasão imunológica de *P. gingivalis*, além de atuar degradando células da micróglia, astrócitos e neurônios. Ilievski et al. (2018) demonstraram essa correlação promovendo a infecção de ratos por um período de 22 semanas, com suspensões padronizadas de *P. gingivalis* em 10^9 UFC/mL, onde a partir da inserção diária de doses de *P. gingivalis* os ratos exibiram a presença das enzimas *gigipains* no interior de células do hipocampo, atingindo os sítios intranuclear, perinuclear e extracelular, além de demonstrar o aumento expressivo na produção das citocinas pró-inflamatórias TNF- α , IL-1 β e IL-6. Assim, os pesquisadores sugerem que a

elevação dessas citocinas estimule a produção das placas amiloides β , responsáveis pela neurodegeneração, pois apenas os ratos infectados por *P. gingivalis* demonstraram a produção de $A\beta_{42}$. Diante de todo esse mecanismo sugerido em correlação a presença de *P. gingivalis* no sítio bucal, o presente trabalho se mostra uma importante terapia a ser pesquisada, uma vez que os extratos de *P. paniculata* e *J. regia* promoveram a eliminação dos biofilmes de *P. gingivalis*, além disso os extratos desempenharam um papel anti-inflamatório, onde *P. paniculata* reduziu a produção da citocina pró-inflamatória IL-1 β e estimulou a produção da citocina anti-inflamatória IL-10. O mesmo ocorre com o extrato de *J. regia* o qual o fitoterápico apresenta reduções nos níveis de TNF- α demonstrando o potencial anti-inflamatório que pode ser empregado no combate ao desenvolvimento da patologia (Eke et al., 2016; Loutan et al., 2019; Arastu-Kapur et al., 2020).

A ação antimicrobiana dos extratos de *P. paniculata* e *J. regia* frente a micro-organismos aeróbios de interesse médio-odontológico já foi verificada em estudo prévio ainda não publicado (dissertação de mestrado), onde foi realizada a análise sobre culturas planctônicas e biofilmes monotípicos de *E. faecalis*, *P. aeruginosa*, *S. aureus*, *S. mutans*, *C. albicans*, *C. glabrata*, *C. guilhermondii*, *C. tropicalis*, *C. krusei* e *C. dubliniensis*. Os resultados obtidos demonstraram que ambos os extratos promoveram reduções percentuais com significância estatística frente aos micro-organismos testados, dando destaque aos resultados obtidos com *P. aeruginosa*, *S. mutans* e as espécies do gênero *Candida*, com os melhores resultados voltados a *C. albicans*, a espécie mais prevalente nas infecções fúngicas humanas. Diante dos resultados obtidos, tornou-se de interesse ampliar as investigações antimicrobianas, verificando, portanto, se os extratos manteriam o potencial antifúngico e antimicrobiano diante da combinação da levedura (*C. albicans*) associada a uma bactéria (*E. faecalis*, *P. aeruginosa*, *S. aureus* e *S. mutans*) (Ramos, 2016).

O estudo realizado durante a dissertação de mestrado demonstra que o biofilme monotípico de *P. aeruginosa* obteve reduções de 23,5 a 8,3% após contato por 5 min. com o extrato de *P. paniculata*, realizando o comparativo com os resultados obtidos no presente estudo é possível verificar que o biofilme heterotípico se mostrou mais resistente a aplicação do extrato, uma vez que apenas a concentração de 200 mg/mL de *P. paniculata* foi capaz de promover redução na biomassa da estrutura, redução está de apenas 6,5%. Já o extrato de *J. regia* demonstrou reduções de 19,8%

a 15,5% na biomassa da estrutura monotípica, já quando aplicado na associação *C. albicans* associada a *P. aeruginosa* o extrato performou um melhor desempenho, obtendo reduções de 32,4%; 29,8% e 11,6%. Em relação ao comparativo no que diz respeito a atividade metabólica, foi possível verificar que a aplicação do extrato de *P. paniculata* sobre o biofilme heterotípico de *C. albicans* e *P. aeruginosa* se mostrou menos efetiva, demonstrando reduções de 20,9%; 19,8% e 0,4% frente as concentrações de 200, 100 e 50 mg/mL enquanto o biofilme monotípico (*P. aeruginosa*) obteve reduções de 78,6% e 33,8% com as concentrações de 200 mg/mL e 100 mg/mL. O extrato de *J. regia* mais uma vez demonstrou melhor desempenho quando aplicado sobre o biofilme heterotípico, com reduções de 79,5% a 60,2%, enquanto a aplicação sobre o biofilme monotípico resultou em reduções de 26,8% a 5,6% (Ramos, 2016)

Em relação a espécie de *S. mutans* o estudo realizado durante a dissertação de mestrado revelou que apenas o extrato de *P. paniculata* promoveu reduções sobre os biofilmes monotípicos, com reduções na biomassa de 15,6% a 14,3%; A comparação com o presente estudo evidencia que o biofilme heterotípico (*C. albicans* e *S. mutans*) se mostrou mais sensível frente ao extrato de *P. paniculata*, onde o mesmo promoveu reduções de 62,0%; 52,7% e 45,8%. O mesmo se pode ser observado com as reduções de atividade metabólica, onde o biofilme monotípico obteve reduções 20,3% a 15,4%, enquanto a interação de *C. albicans* e *S. mutans* obtiveram reduções de 71,1%; 18,2% e 1,13% após as concentrações de 200, 100 e 50 mg/mL. É importante destacar também que o extrato de *J. regia* demonstrou melhor eficácia quando aplicado sobre o biofilme heterotípico demonstrando reduções de 89,2% a 79,0%, enquanto o biofilme monotípico foi fracamente afetado pelo tratamento (Ramos, 2016).

Em literatura a aplicação do extrato de *P. paniculata* como agente antimicrobiano é escasso, renderizando apenas 1 artigo publicado, o qual é de autoria do presente grupo de estudo, porém a atividade antimicrobiana de *J. regia* já rende um número maior de resultados como exemplo o trabalho de Gomes et al. (2019) o qual os pesquisadores formularam os extratos metanólicos de *J. regia* isolada e em combinação com *Eucalyptus globulus*. Para os testes antimicrobianos foi utilizada a cepa ATCC 25923 de *S. aureus*, semelhante a cepa utilizada no presente estudo, os pesquisadores indicaram que o extrato demonstrou atividade antimicrobiana uma vez

que foi capaz de promover CIM de 25 mg/mL do extrato de *J. regia*, além de verificar que o mesmo possui ação antibiofilme promovendo a diminuição de até 3 logs após contato por 24 h de aplicação do extrato, utilizando a concentração de 400 mg/mL. Apesar das diferenças metodológicas a comparação dos estudos demonstra que ambos os extratos promoveram ação antimicrobiana, seja no biofilme monotípico o qual Gomes et al. (2019) demonstraram a diminuição logarítmica ou no presente trabalho o qual se foi aplicado o extrato sobre biofilme heterotípico de *S. aureus* associado a *C. albicans*, resultando em reduções de 11,9% na biomassa e 23,0% na atividade metabólica dos micro-organismos. Torna-se importante ressaltar que os extratos foram formulados com eluentes diferentes, sendo o estudo de Gomes et al. (2019) um extrato metanólico enquanto o extrato no presente trabalho foi utilizado um extrato glicólico, em propilenoglicol. A variabilidade de redução entre os estudos pode ser discutida por diversas formas, seja pela constituição do biofilme ou pela sua matriz polimérica distintas entre biofilmes monotípicos ou heterotípicos. Também pode-se indicar a variação de concentrações aplicadas, onde Gomes et al. (2019) utilizaram a concentração de 400 mg/mL do extrato de *J. regia* pelo tempo de 24 h sobre os biofilmes, enquanto o presente estudo utilizou a concentração de 200 mg/mL pelo mesmo tempo de aplicação.

O extrato de *J. regia* também já teve sua ação anti-*Candida* verificada, onde Raja et al. (2017) verificaram a atuação do extrato etanólico da planta frente a cepa ATCC 10261 de *C. albicans*. A espécie vegetal promoveu CIM de 700 µg/mL do extrato etanólico, além de demonstrar que o fitoterápico reduziu a secreção de proteinases e fosfolipases, indicando a diminuição dos fatores de virulência e invasão tecidual da levedura. Resultado este que reforça os dados obtidos pelo presente trabalho onde os biofilmes heterotípicos, compostos sempre por *C. albicans* associada a uma bactéria, obtiveram até 79,5% de redução após contato por 24 h com o extrato glicólico de *J. regia*.

Os dados obtidos do comparativo de ação entre os biofilmes heterotípicos e monotípicos são de extrema importância, uma vez que as infecções humanas em geral não se desenvolve com apenas uma espécie de microbiana e sim pela interação de múltiplas espécies dos mesmos. Outro aspecto importante entre este comparativo se dá pela constituição do biofilme, onde os biofilmes monotípicos e heterotípicos apresentam constituições moleculares distintas, guiando assim os passos futuros do

presente trabalho para que se possa identificar o local de ação desses fitoterápicos nas estruturas microbianas.

O espectro de ação dos extratos de *P. paniculata* e *J. regia* também foi verificado sobre cepas multirresistentes de *K. pneumoniae*, demonstrando reduções sobre culturas planctônicas e biofilmes do patógeno. Como descrito anteriormente, a atividade antimicrobiana de ambos os extratos é escassa, sendo o trabalho do presente grupo de estudo o único publicado na literatura consultada até o presente momento. O estudo publicado evidencia que o extrato de *P. paniculata* promoveu CIM com 12,5 mg/mL e CMM com 25 mg/mL, enquanto *J. regia* demonstrou CIM e CMM com 6,25 mg/mL. Os valores obtidos pelo presente estudo divergem dos resultados do estudo anterior, uma vez que a cepa 386546 obteve CIM com 25 mg/mL do extrato de *P. paniculata*, enquanto as cepas 400381 e 367725 obtiveram CIM com 50 mg/mL. Os valores de CMM frente as cepas 386546, 400381 e 367725 foi de 50 mg/mL para ambos os extratos. A divergência nos resultados, entre concentração e efeito, pode se explicado nas cepas microbianas onde o presente estudo utilizou cepas clínicas com múltiplo perfil de resistência antimicrobiana, enquanto o estudo publicado em 2016 utilizou cepa ATCC de *K. pneumoniae* (ATCC 4352) a qual não apresenta nenhum perfil de resistência a fármacos (Paula-Ramos et al., 2016). Desta forma pode-se verificar a importância de analisar os efeitos antimicrobianos dos extratos sobre cepas clínicas que refletem o panorama mundial de resistência, sendo que esta pesquisa estudo traz importante contribuição no estudo de novos antimicrobianos para bactérias multirresistentes.

Os resultados antimicrobianos frente a *K. pneumoniae*, evidenciado por ambos os estudos, é de grande relevância clínica, uma vez que *K. pneumoniae* é frequentemente causadora de infecções hospitalares, com elevadas taxas de mortalidade e morbidade, além de ser considerada pela OMS como patógeno de prioridade para o desenvolvimento de novo fármaco (WHO, 2017). Assim os resultados aqui apresentados demonstram que ambos os extratos foram capazes de promover reduções que variaram de 67,9% a 11,0%, com apenas 5 min. de contato com a estrutura do biofilme de cepas com perfil múltiplo de resistência (Areppeva et al., 2017).

A ação antimicrobiana de ambos os extratos, promovida sobre as diferentes espécies de micro-organismos pode ser reforçada ainda através dos resultados obtidos com a análise fitoquímica, uma vez que no extrato de *P. paniculata* á presença de compostos fenólicos, derivados da benzofenona, moléculas que exibem ação antiviral, antibacteriana e antifúngica já comprovadas em literatura (Ochensberger et al., 2019; Lima et al., 2019; Ji et al., 2020). O mesmo se pode observar sobre *J. regia*, o qual demonstrou a presença do ácido cafeoilquínico, composto químico que possui ação antibacteriana sobre gram positivos (Fiamegos et al., 2011).

Além da atividade antimicrobiana a investigação dos efeitos biológicos de *P. paniculata* e *J. regia* também contou com a avaliação da atividade anti-inflamatória dos compostos. Apesar do número escasso de estudos, é possível verificar em literatura que *P. paniculata* apresenta ação anti-inflamatória, como exemplo o estudo de Costa et al. (2015) no qual os pesquisadores induziram inflamação intestinal em ratos Wistar e posteriormente administraram doses de 25, 50, 100 e 200 mg/kg do extrato metanólico de *P. paniculata*, para avaliação histológica e verificação dos níveis de citocinas pró-inflamatórias. A pesquisa concluiu que a administração da concentração de 200mg/kg gerou a diminuição dos níveis TNF- α , IL-1 β e IL-6, diminuição semelhante a apresentada pelo grupo o qual recebeu doses de prednisolona. Os achados de Costa et al. (2015) reforçam os resultados obtidos no presente estudo, onde macrófagos de camundongo (RAW 264-7) estimulados por LPS de *Escherichia coli*, obtiveram um efeito anti-inflamatório após contato por 24 h com o extrato glicólico de *P. paniculata*, na concentração de 25 mg/mL exibindo a diminuição nos níveis de IL-1 β e aumento na produção da citocina anti-inflamatória IL-10. Os estudos divergem apenas na redução dos níveis de TNF- α , onde os resultados do presente estudo não demonstram reduções na produção de TNF- α .

Alguns trabalhos avaliam a atividade anti-inflamatória do extrato de *J. regia*, como exemplo Vieira et al. (2020) o qual verificaram que a administração das concentrações de 500 a 7.8 μ g/mL do extrato hidroalcoólico da arvore promoveu a diminuição de 50% dos níveis de óxido nítrico, produzido por macrófagos de camundongo (RAW 264-7). A ação anti-inflamatória foi verificada também por Wang et al. (2020), o qual os pesquisadores buscaram elucidar se o extrato de *J. regia* poderia imunomodular a inflamação corporal de ratas estimuladas por LPS. Os pesquisadores concluíram que os níveis de citocinas TNF- α , IL-1 β e IL-6 foram

reduzidos severamente, através da diminuição da síntese de RNAm, além de diminuir os níveis de Oxigênios reativos no organismo das ratas. Os resultados obtidos por Wang et al. (2020) são semelhantes ao obtido no presente estudo em relação a citocina pró-inflamatória TNF- α , o qual obteve queda em sua síntese, porém há divergência nos achados com IL-1 β , onde o presente trabalho demonstrou aumento na citocina pró-inflamatória (IL-1 β), enquanto os pesquisadores sinalizaram a diminuição da mesma, indicando assim que são necessários mais estudos para avaliar o real efeito anti-inflamatório de *J. regia* (Dong et al., 2018).

Diante das atividades biológicas verificadas, dos extratos de *P. paniculata* e *J. regia*, a análise da toxicidade celular se torna indispensável para que os mesmos possam ser utilizados como possíveis fármacos. No presente trabalho o extrato de *P. paniculata* demonstrou toxicidade aplicado sobre a linhagem RAW 264-7, obtendo viabilidade celular abaixo de 50% após contato por 5 min. Já a aplicação pelo tempo de 24 h resultou em viabilidade celular superior a 50% com as concentrações abaixo de 12,5 mg/mL. Buscando confrontar os presentes dados com a literatura, são encontrados apenas dois trabalhos o qual avaliam a atividade citotóxica do composto, sendo o estudo de Eberlin et al. (2009) e Mozar et al. (2015). No estudo de Eberlin et al. (2009), os pesquisadores verificaram a atuação de um creme dermatológico formulado em butilenoglicol com a presença do extrato de *P. paniculata* associados a *Ptychopetalum olacoides* e *Lilium candidum*. Os testes foram realizados sobre 21 pacientes saudáveis, com idade variando de 20 a 55 anos com a finalidade de promover a diminuição de manchas escuras ao redor dos olhos e após o período de tratamento, os pesquisadores concluíram que o creme formulado atua como um importante anti-inflamatório promovendo a diminuição significativa das manchas enegrecidas, não evidenciando nenhuma toxicidade sobre as pacientes. Analisando os dados descritos é possível notar que a toxicidade do extrato é variável conforme o tipo celular, uma vez que o extrato de *P. paniculata* não promoveu toxicidade sobre a linhagem de queratinócitos humanos (HaCat) tanto no presente trabalho como no estudo de Eberlin et al. (2009). O qual os pesquisadores aplicaram o tratamento diretamente sobre a pele dos pacientes, não obtendo nenhum tipo de reação adversa sobre o tecido epitelial. Isso pode ser explicado devido aos queratinócitos apresentarem maior resistência a fatores externos devido a sua resposta adaptativa ao

contato recorrente com diversos tipos de agressões (Kleczkowska e Althaus FR, 1996; Maciel et al., 2019).

A ausência de toxicidade sobre queratinócitos também pode ser comprovada pela análise fitoquímica, onde o presente estudo comprovou a presença de benzofenonas no extrato glicólico de *P. paniculata*, substância essa que possui efeitos fotoprotetores sobre queratinócitos. O mecanismo de ação das benzofenonas envolve a potencialização de enzimas antioxidantes como a SOD (Superóxido dismutase) e a Glutathione peroxidase (GPx), que atuam combatendo espécies reativas de oxigênio, além da atuação da enzima CAT (Catalase) como catalisadora das reações antioxidantes. A potencialização desse efeito antioxidante protege as células dos efeitos oxidantes que a radiação ultravioleta ou elementos químicos podem causar sobre os queratinócitos, assim o extrato demonstra um efeito protetor sobre a célula. (Guaratini et al., 2008; Huber et al., 2008; Lima et al., 2019; Huang et al., 2020) A atuação das Benzofenonas também pode ser observado no trabalho de Mozar et al. (2015), onde o extrato de *P. paniculata* foi aplicado sobre hemácias falcemizadas, resultando no aumento da vida útil da célula, sugerindo a diminuição da hemólise em pacientes portadores da hemoglobinopatia, além de não promover toxicidade sobre hemácias saudáveis. Os pesquisadores creditaram este efeito devido ao potencial antioxidante de *P. paniculata*, uma vez que a glutathione está envolvida na manutenção constante da redução de agentes oxidantes sobre as hemácias, outro ponto importante a se destacar está na produção excessiva de oxigênios reativos que hemácias falcemicas produzem, assim o extrato atuou potencializando o ação da enzima em retirar em agentes oxidantes gerados.

No que diz respeito ao tecido sanguíneo o extrato de *P. paniculata* não demonstrou toxicidade sobre hemácias no estudo de Mozar et al. (2015), apesar disso o presente trabalho demonstrou que a linhagem de macrófagos de camundongo se mostrou sensível ao contato com o extrato, fato este que pode estar relacionado ao efeito antioxidante de *P. paniculata*, uma vez que macrófagos possuem baixas concentrações da enzima Glutathione, já que são células que precisam criar espécies reativas de oxigênio para que possam combater micro-organismos invasores. Característica oposta ao que o extrato é capaz de promover, tendo em vista que compostos benzofenólicos estimulam o combate a radicais livres, sendo assim o extrato atua contra a fisiologia natural da célula imunológica.

Analizando o fato que diferentes grupamentos celulares não se mostraram afetados pelo contato com *P. paniculata* e que os macrófagos também se mostraram sensíveis a aplicação da solução antimicrobiana de clorexidina a 0,12% e 0,06% com reduções em mais de 68% da viabilidade celular, sendo este um fármaco já amplamente utilizado pela população, concluímos que a linhagem celular se mostra mais sensível a agentes químicos, tendo por base ser uma célula constituinte do sistema imunológico, o qual precisa ter alta reatividade aos compostos divergentes de sua constituição molecular.

A maior resistência da linhagem de queratinócitos humanos (HaCat) também pode ser verificada na avaliação da genotoxicidade, onde a mesma apresentou resistência a aplicação de ethilmetanosulfanato, uma substância genotóxica, o qual a utilização deste grupo controle (+) não exibiu a formação de muitos micronúcleos, sendo semelhante estatisticamente ($p > 0,05\%$) ao grupo controle (-) o qual teve contato apenas com o meio de cultivo celular. Característica completamente distinta da linhagem de macrófagos de camundongo (RAW 264-7), o qual exibiu a sensibilidade esperada frente a substância genotóxica (ethylmetanosulfanato), produzindo muitos micronúcleos. Frente a linhagem de macrófagos ambos os extratos (*P. paniculata* e *J. regia*) demonstraram não ser genotóxicos, uma vez que a formação de micronúcleos exibiu semelhança estatística ($p > 0,05\%$) ao grupo controle (-), o qual recebeu apenas a aplicação do meio de cultivo celular. A avaliação da citotoxicidade e genotoxicidade de ambos os extratos sobre as linhagens de macrófagos de camundongo (RAW 264-7) e queratinócitos humanos (HaCat) é um dado inexistente diante da literatura consultada, onde se torna importante destacar que o extrato de *J. regia* promoveu viabilidade celular com valores superior a 50% frente as duas linhagens, além disso o mesmo não apresentou genotoxicidade, resultados pioneiros, que tornam o extrato um importante produto de eleição para a formulação de um novo fármaco, uma vez que o mesmo demonstrou ação antimicrobiana, ação anti-inflamatória, baixa toxicidade celular além de ausência de genotoxicidade.

O presente trabalho elucidou importantes atividades biológicas dos fitoterápicos alvos desta pesquisa demonstrando uma importante ação antioxidante, anti-inflamatória, ausência de genotoxicidade e ação antimicrobiana frente a patógenos de grande relevância clínica. Com isso torna-se importante continuar os estudos nesta área para que se possam também identificar os mecanismos de ação

nas estruturas celulares ou fúngicas a fim de elucidar os possíveis encaixes moleculares o qual os extratos irão realizar frente as membranas biológicas de contato para que estes compostos fitoquímicos se tornem um fármaco.

5 CONCLUSÃO

Os extratos de *P. paniculata* e *J. regia* obtiveram ação antimicrobiana frente aos micro-organismos anaeróbios *P. gingivalis*, *P. endodontalis*, *P. micra* e *F. nucleatum*, promovendo concentração microbicida mínima frente a todas as espécies e obtendo reduções sobre os biofilmes monotípicos, dando destaque aos resultados obtidos com *P. gingivalis*, *P. endodontalis* e *P. micra* o qual os extratos promoveram a completa eliminação dos biofilmes.

Os extratos demonstraram ação antimicrobiana frente as 3 cepas multirresistentes de *K. pneumoniae*, obtendo CIM e CMM frente as culturas planctônicas além de promover ação antibiofilme.

Os biofilmes heterotípicos de *C. albicans* associada a uma bactéria, sendo elas *S. aureus*, *E. faecalis*, *S. mutans* ou *P. aeruginosa* também foram afetados pela aplicação dos extratos, dando destaque as reduções promovidas pelo extrato de *P. paniculata* sobre as interações de *C. albicans* associada a *S. mutans* e *C. albicans* associada a *E. faecalis*. O extrato de *J. regia* demonstrou maior ação frente aos biofilmes de *C. albicans* associada a *S. mutans*; *C. albicans* associada a *E. faecalis* e *C. albicans* associada a *P. aeruginosa*.

A toxicidade celular obteve variações conforme a linhagem celular verificada, onde o extrato de *J. regia* não promoveu ação citotóxica sobre a linhagem de queratinócitos humanos (HaCat). Para o extrato de *P. paniculata* a ausência de toxicidade se iniciou a partir da concentração de 12,5 mg/mL do extrato para ambos os tempos de contato. Sobre a cultura de macrófagos de camundongo (RAW 264-7) o extrato de *P. paniculata* não exibiu toxicidade a partir da concentração de 6,25 mg/mL com o tempo de contato de 24 h, enquanto o extrato de *J. regia* não exibiu toxicidade com as concentrações de 150 e 100 mg/mL.

Ambos os extratos não promoveram genotoxicidade sobre as linhagens celulares de macrófagos de camundongo (RAW 264.7) e Queratinócitos humanos (HaCat).

O extrato de *P. paniculata* exibiu ação anti-inflamatória reduzindo a produção da citocina pró-inflamatória IL-1 β e aumentando a produção da citocina anti-

inflamatória IL-10. Já o extrato de *J. regia* desempenhou efeito anti-inflamatório reduzindo os níveis de TNF- α .

Foi identificada a presença de alguns derivados da benzofenona no extrato glicólico de *P. paniculata*. Já para o extrato de *J. regia* se foi identificado a presença de ácido cafeoilquínico, derivado do ácido cafeico.

Ambos os extratos apresentam potencial antioxidante variando apenas a concentração dos mesmos para obter a redução de 50% dos radicais livres.

REFERÊNCIAS*

Abe FC, Bergamaschi CC, Figueiró MF, Lopes LC. Resistance profile to antimicrobial agents in the main circulating bacteria isolated from acute periodontal and endodontic infections in Latin America (MICROBE- DENT): A systematic review protocol. *Medicine (Baltimore)*. 2018;97(48):e13158. doi: 10.1097/MD.00000000000013158.

Ada Yonath. “Se não criarmos novos antibióticos, as pessoas morrerão aos 50 ou 60 anos, como antes”: Prêmio Nobel de Química Ada Yonath alerta que resistência bacteriana causará mortes na metade da vida [Entrevista a Ana Alfageme]. *El País*, 2019.

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: 1014-20.

Ananth-Shenoy P, Vishwanath S, Targain R, Shetty S, Sunil-Rodrigues G, Mukhopadhyay C, Chawla K. Anaerobic infections in surgical wards: a two year study. *Iran J Microbiol*. 2016 Jun;8(3):181-6.

Arastu-Kapur S, Nguyen M, Raha D, Ermini F, Haditsch U, Araujo J, et al. Treatment of *Porphyromonas gulae* infection and downstream pathology in the aged dog by lysine-gingipain inhibitor COR388. *Pharmacol Res Perspect*. 2020;8(1):e00562. doi:10.1002/prp2.562

Arepyeva MA, Kolbin AS, Sidorenko SV, Lawson R, Kurylev AA, Balykina YE, et al. A mathematical model for predicting the development of bacterial resistance based on the relationship between the level of antimicrobial resistance and the volume of antibiotic consumption. *J Glob Antimicrob Resist*. 2017;8:148-56. doi: 10.1016/j.jgar.2016.11.010.

Brook I. Microbiology of chronic rhinosinusitis. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*. 2016;35(7):1059-68. doi: 10.1007/s10096-016-2640-x.

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.

da Silva TC, Cogliati B, Latorre AO, Akisue G, Nagamine MK, Haraguchi M, et al. Pfaffosidic Fraction from *Hebanthe paniculata* Induces Cell Cycle Arrest and Caspase-3-Induced Apoptosis in HepG2 Cells. *Evid Based Complement Alternat Med*. 2015;2015:835796. doi: 10.1155/2015/835796.

* 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 2017]. U.S. National Library of Medicine; [about 6 p.]. Disponível em: http://www.nlm.nih.gov/bsd/uniform_requirements.html

Dong ZW, Yuan YF. Juglanin suppresses fibrosis and inflammation response caused by LPS in acute lung injury. *Int J Mol Med*. 2018;41(6):3353–65. doi:10.3892/ijmm.2018.3554

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 Jun;8(2):127-35. doi: 10.1111/j.1473-2165.2009.00438.x.

Eke PI, Wei L, Borgnakke WS, Thornton-Evans G, Zhang X, Lu H, et al. Periodontitis prevalence in adults ≥ 65 years of age, in the USA. *Periodontol* 2000. 2016;72(1):76–95. 10.1111/prd.12145

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, Eduardo J. Pilau EJ, Cortez DAG. Phytochemical Analysis of *Pfaffia glomerata* Inflorescences by LC-ESI-MS/M. *Molecules*. 2014;19:15720-34; doi:10.3390/molecules191015720

Fernández-Agulló A, Pereira E, Freire MS, Valentão P, Andrade PB, González-Álvarez J, et al. Influence of solvent on the antioxidant and antimicrobial properties of walnut (*Juglans regia* L.) green husk extracts. *Industrial Crops and Products*. 2013; 42:126-132. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2012.05.021>

Fiamegos YC, Kastritis PL, Exarchou V, Han H, Bonvin AM, Vervoort J, et al. Antimicrobial and efflux pump inhibitory activity of caffeoylquinic acids from *Artemisia absinthium* against gram-positive pathogenic bacteria. *PLoS One*. 2011;6(4):e18127. doi:10.1371/journal.pone.0018127

Freitas CS, Baggio CH, Twardowschy A, dos Santos AC, Mayer B, Luiz AP, et al. Involvement of glutamate and cytokine pathways on antinociceptive effect of *Pfaffia glomerata* in mice. *J Ethnopharmacol*. 2009;122(3):468-72. doi:10.1016/j.jep.2009.01.033

Guaratini T, Medeiros MHG, Colepicolo P. Antioxidantes na manutenção do equilíbrio redox cutâneo: uso e avaliação de sua eficácia. *Quím. Nova*. 2007;30(1), 206-13. <https://doi.org/10.1590/S0100-40422007000100033>

Gomes F, Martins N, Ferreira ICFR, Henriques M. Anti-biofilm activity of hydromethanolic plant extracts against *Staphylococcus aureus* isolates from bovine mastitis. *Heliyon*. 2019 May 22;5(5):e01728. doi: 10.1016/j.heliyon.2019.e01728. eCollection 2019 May.

Hickl J, Argyropoulou A, Sakavitsi ME, Halabalaki M, Al-Ahmad A, Hellwig E, et al. Mediterranean herb extracts inhibit microbial growth of representative oral microorganisms and biofilm formation of *Streptococcus mutans*. *PLoS One*. 2018;13(12):e0207574. Published 2018 Dec 12. doi:10.1371/journal.pone.0207574

Hosseini S, Huseini HF, Larijani B, Mohammad K, Najmizadeh A, Nourijelyani K, Jamshidi L. The hypoglycemic effect of *Juglans regia* leaves aqueous extract in diabetic patients: A first human trial. *Daru*. 2014 Jan 21;22(1):19. doi: 10.1186/2008-2231-22-19.

Huang X, Li Y, Wang T, Liu H, Shi J, Zhang X. Evaluation of the Oxidative Stress Status in Zebrafish (*Danio rerio*) Liver Induced by Three Typical Organic UV Filters (BP-4, PABA and PBSA). *Int J Environ Res Public Health*. 2020;19;17(2). pii: E651. doi: 10.3390/ijerph17020651.

Huber PC, Almeida WP, Fátima A. Glutathione and related enzymes: biological roles and importance in pathological processes. *Quím. Nova*, 2008; 31(5)1170-79 <https://doi.org/10.1590/S0100-40422008000500046>

Ilievski V, Zuchowska PK, Green SJ, Toth PT, Ragozzino ME, Le K, et al. Chronic oral application of a periodontal pathogen results in brain inflammation, neurodegeneration and amyloid beta production in wild type mice. *PLoS One*. 2018;13(10):e0204941. Published 2018 Oct 3. doi:10.1371/journal.pone.0204941

Ji YB, Chen WJ, Shan TZ, Sun BY, Yan PC, Jiang W. Antibacterial Diphenyl Ether, Benzophenone and Xanthone Derivatives from *Aspergillus flavipes*. *Chem Biodivers*. 2020;17(2):e1900640. doi: 10.1002/cbdv.201900640.

Joshan DS, Singh SK. Investigational study of *Juglans regia* extract and quercetin against photoaging. *Biomed. Aging Pathol*. 2013; 3(4):193-200

Kleczkowska HE, Althaus FR. Biochemical changes associated with the adaptive response of human keratinocytes to N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine. *Mutat Res*. 1996 Jun 12;368(2):121-31.

Kuang X, Chen V, Xu X. Novel Approaches to the Control of Oral Microbial Biofilms. *Biomed Res Int*. 2018; 31;2018:6498932. doi: 10.1155/2018/6498932. eCollection 2018.

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; 54,38-45

Li C, Zhang Z, Zhang S, Yan W, Si C, Lee MH, et al. Inhibitory Effects of the Extracts of *Juglans sigillata* Green Husks on the Proliferation, Migration and Survival of KYSE150 and EC9706 Human Esophageal Cancer Cell Lines. *Nutr Cancer*. 2019;71(1):149-58. doi: 10.1080/01635581.2018.1557223.

Lima AMA, Teixeira TR, Silva BFS, Raoni P, Silva IEP, Santos EG, Fernandes MC, et al. Síntese e avaliação das atividades fotoprotetora, citotóxica e antiviral contra o zika vírus de derivados triazólicos da benzofenona. *Quím. Nova*. 2019;42(5):473-84. <https://doi.org/10.21577/0100-4042.20170365>

Loutan L, Alpizar-Rodriguez D, Courvoisier DS, Finckh A, Mombelli A, Giannopoulou C. Periodontal status correlates with anti-citrullinated protein antibodies in first-degree relatives of individuals with rheumatoid arthritis. *J Clin Periodontol*. 2019 Jul;46(7):690-698. doi: 10.1111/jcpe.13117.

Maciel B, Moreira P, Carmo H, Gonçalo M, Lobo JMS, Almeida IF. Implementation of an in vitro methodology for phototoxicity evaluation in a human keratinocyte cell line. *Toxicol In Vitro*. 2019 Dec;61:104618. doi: 10.1016/j.tiv.2019.104618.

Marchioretto MS, Miotto STS, Siqueira JC. The genus *Pfaffia* Mart. (Amaranthaceae) in Brazil. *Hoehnea*. 2010;37(3):461-511. doi:10.1590/S2236-89062010000300004

Mohieldin EAM, Muddathir AM, Mitsunaga T. Inhibitory activities of selected Sudanese medicinal plants on *Porphyromonas gingivalis* and matrix metalloproteinase-9 and isolation of bioactive compounds from *Combretum hartmannianum* (Schweinf) bark. *BMC Complement Altern Med*. 2017 Apr 20;17(1):224. doi: 10.1186/s12906-017-1735-y.

Mozar A, Charlot K, Sandor B, Rabaï M, Lemonne N, Billaud M, et al. *Pfaffia paniculata* extract improves red blood cell deformability in sickle cell patients. *Clin Hemorheol Microcirc*. 2015; 25;62(4):327-33. doi: 10.3233/CH-151972.

Muzaffer U, Paul VI, Agilan B, Prasad NR. Protective effect of *Juglans regia* L., against ultraviolet-B induced photoaging in human epidermal keratinocytes. *Biomed Pharmacother*. 2019 Mar;111:724-32. doi: 10.1016/j.biopha.2018.12.129.

Nagamine MK, da Silva TC, Matsuzaki P, Pinello KC, Cogliati B, Pizzo CR, et al. Cytotoxic effects of butanolic extract from *Pfaffia paniculata* (Brazilian ginseng) on cultured human breast cancer cell line MCF-7. *Exp Toxicol Pathol*. 2009;61(1):75-82. doi: 10.1016/j.etp.2008.01.017.

Nakamura S, Chen G, Nakashima S, Matsuda H, Pei Y, Yoshikawa M. Brazilian natural medicines. IV. New noroleanane-type triterpene and ecdysterone-type sterol glycosides and melanogenesis inhibitors from the roots of *Pfaffia glomerata*. *Chem Pharm Bull (Tokyo)*. 2010;58(5):690-5.

Nishimoto N, Nakai S, Takagi N, Hayashi S, Takemoto T, Odashima S, et al. Pfaffosides and nortriterpenoid saponins from *Pfaffia paniculata*. *Phytochemistry*. 1984; 23 139-142

Ochensberger S, Alperth F, Mitić B, Kunert O, Mayer S, Mourão MF. Phenolic compounds of *Iris adriatica* and their antimycobacterial effects. *Acta Pharm*. 2019; 1;69(4):673-81. doi: 10.2478/acph-2019-0037.

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.

Paula-Ramos L, da Rocha Santos CE, Camargo Reis Mello D, et al. *Klebsiella pneumoniae* Planktonic and Biofilm Reduction by Different Plant Extracts: In Vitro Study. ScientificWorldJournal. 2016;2016:3521413. doi:10.1155/2016/3521413

Raja V, Ahmad SI, Irshad M, Wani WA, Siddiqi WA, Shreaz S. Anticandidal activity of ethanolic root extract of *Juglans regia* (L.): Effect on growth, cell morphology, and key virulence factors. J Mycol Med. 2017 Dec;27(4):476-486. doi: 10.1016/j.mycmed.2017.07.002. Epub 2017 Aug 4.

Paula-Ramos L, Santos CER, Mello DCR, Theodoro LN, Oliveira FE, Back Brito GN, et al. *Klebsiella pneumoniae* Planktonic and Biofilm Reduction by Different Plant Extracts: In Vitro Study. TheScientificWorldJournal. 2016; 3521413. <https://doi.org/10.1155/2016/3521413>

Pardeep Sharma G, Ravikumar M, Kalaiselvi D, Gomathi C. In vitro antibacterial and free radical scavenging activity of green hullof *Juglans regia*. J. Pharm. Anal. 2013;3(4):298–302.

Paul D, Chakraborty R, Mandal SM. Biocides and health-care agents are more than just antibiotics: Inducing cross to co-resistance in microbes. Ecotoxicol Environ Saf. 2019 Jun 15;174:601-610. doi: 10.1016/j.ecoenv.2019.02.083.

Ramos LP. 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.

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

Rodrigues MVN, Souza KP, Rehder VLR, Vilela GF, Júnior IM, Figueira GM, Rath S. Development of an analytical method for the quantification of pfaffic acid in Brazilian ginseng (*Hebanthe eriantha*). J. Pharm. Biomed. Anal. Analysis. 2013;77:76-82

Ruberto G, Baratta MT, Deans SG, Dorman HJ. Antioxidant and antimicrobial activity of *Foeniculum vulgare* and *Crithmum maritimum* essential oils. Planta Med. 2000 Dec;66(8):687-93.

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.

Shiobara Y, Inoue SS, Kato K, Nishiguchi Y, Oishi Y, Nishimoto N, et al. A nortriterpenoid, triterpenoids and ecdystereoids from *Pfaffia glomerata*. Phytochemistry 1993;32,1527–30.

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: 1057-60.

Verma RS, Padalia RC, Chauhan A, Thul ST. Phytochemical analysis of the leaf volatile oil of walnut tree (*Juglans regia* L.) from western Himalaya. *Ind. Crop. Prod.* 2013; 42: 195-201.

Vieira V, Pereira C, Abreu RMV, Calhelha RC, Alves MJ, Coutinho JAP, et al. Hydroethanolic extract of *Juglans regia* L. green husks: A source of bioactive phytochemicals. *Food Chem Toxicol.* 2020; 8:111189. doi: 10.1016/j.fct.2020.111189.

Wang S, Zheng L, Zhao T, Zhang Q, Liu Y, Sun B, et al. Inhibitory effects of walnut (*Juglans regia*) peptides on neuroinflammation and oxidative stress in lipopolysaccharide-induced cognitive impairment mice. *J. Agric. Food Chem.* 2020; 68,8,2381-92. doi: 10.1021/acs.jafc.9b07670.

World Health Organization - WHO. Global priority list of antibiotic-resistant bacteria to guide research, discovery, and development of new antibiotics. [Internet]. 2017. [Cited ano mes dia]. Available from: https://www.who.int/medicines/publications/WHO-PPL-Short_Summary_25Feb-ET_NM_WHO.pdf

ANEXO A - Laudo do extrato glicólico de *Pfaffia paniculata*, comercializado pela empresa MAPRIC



EXTRATO GLICÓLICO DE PFÁFFIA (HG)

Nome Científico: *Pfaffia paniculata* Kuntze / Amaranthaceae

INCI: Pfaffia Paniculata Root 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 pfáffico; fassosídeos; 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 Medicinais. 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 do extrato glicólico de *Juglans regia*, comercializado pela empresa MAPRIC



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, ant queda 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° 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 Medicinais. Ed. Helmus, 1994. Coimbra, R.; Manual de Fitoterapia. Ed. CEJUP, 1994.

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