



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

**CAROLINE MARIA FERREIRA**

**EXTRATO GLICÓLICO DE ROSA CENTIFOLIA L.: atividade anti-  
inflamatória e antibiofilme sobre bactérias anaeróbias de interesse  
odontológico**

2022

**CAROLINE MARIA FERREIRA**

**EXTRATO GLICÓLICO DE ROSA CENTIFOLIA L.: atividade anti-inflamatória e antibiofilme sobre bactérias anaeróbias de interesse odontológico**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao Instituto de Ciência e Tecnologia, Universidade Estadual Paulista (Unesp), Campus de São José dos Campos, como parte das exigências para a obtenção do grau de CIRURGIÃO-DENTISTA.

Orientadora: Profa. Assoc. Luciane Dias de Oliveira

Coorientadora: Profa. Thais Cristine Pereira

São José dos Campos

2022

Instituto de Ciência e Tecnologia [internet]. Normalização de tese e dissertação [acesso em 2022]. 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).

Ferreira, Caroline Maria

Extrato glicólico de Rosa centifolia L.: atividade anti-inflamatória e antibiofilme sobre bactérias anaeróbias de interesse odontológico / Caroline Maria Ferreira. - São José dos Campos : [s.n.], 2022.

34 f. : il.

Trabalho de Conclusão de Curso (TCC) - Graduação em Odontologia - Universidade Estadual Paulista (Unesp), Instituto de Ciência e Tecnologia, São José dos Campos, 2022.

Orientador: Luciane Dias de Oliveira

Coorientador: Thais Cristine Pereira

1. Atividade anti-inflamatória. 2. Biofilme. 3. Parvimonas micra. 4. Prevotella intermedia. 5. Rosa centifolia L. I. Oliveira, Luciane Dias de, orient. II. Pereira, Thais Cristine, coorient. III. Universidade Estadual Paulista (Unesp), Instituto de Ciência e Tecnologia, São José dos Campos.

IV. Universidade Estadual Paulista 'Júlio de Mesquita Filho' - Unesp. V. Universidade Estadual Paulista (Unesp). VI. Título.

Ficha catalográfica elaborada pela Biblioteca Prof. Achille Bassi e Seção Técnica de Informática, ICMC/USP com adaptações - STATI, STRAUD e DTI do ICT/UNESP.

## **BANCA EXAMINADORA**

**Profa. Assoc. Luciane Dias de Oliveira** (Orientador)

Universidade Estadual Paulista (Unesp)

Instituto de Ciência e Tecnologia

Departamento Biociências e diagnóstico bucal

**Profa. Assoc. Maria Aparecida Neves Jardim**

Universidade Estadual Paulista (Unesp)

Instituto de Ciência e Tecnologia

Departamento Diagnóstico e Cirurgia

**Profa. Assoc. Dra. Juliana Campos Junqueira**

Universidade Estadual Paulista (Unesp)

Instituto de Ciência e Tecnologia

Departamento Biociências e diagnóstico bucal

São José dos Campos, 04 de julho de 2022.

## DEDICATÓRIA

Aos meus pais, **Rosemeire Maria Ferreira** e **Celso de Alencar Martins Ferreira**, pela dedicação e esforço durante todos esses anos de incentivo e apoio.

Às minhas irmãs, **Mariana Ferreira** e **Giovana Maria Ferreira**, pelo companheirismo e paciência nos dias difíceis.

Ao meu namorado, **Vinícius Luiz Silva Gino**, por todo carinho, apoio e dedicação, tê-lo ao meu lado me impulsionou tornando essa caminhada mais leve.

## **AGRADECIMENTOS**

Agradeço à professora Dra. Luciane Dias de Oliveira e minha coorientadora Thais Cristine Pereira, por todo apoio, dedicação e incentivo diante dos desafios encontrados em toda a trajetória de Iniciação Científica, me guiaram com excelência e profissionalismo para realização desse trabalho. Muito obrigada.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pela concessão da bolsa, através do Processo nº 2019/16543-0, durante todo o período de vigência, entre 01/09/2019 a 31/03/2022.

A todos os professores e funcionários do Instituto de Ciência e Tecnologia – ICT UNESP pela colaboração para a minha formação profissional e pessoal e todos os meus amigos que me apoiaram no sentido profissional, acadêmico e pessoal, em especial à minha companheira de clínicas Allanis Mota da Silva, que esteve ao meu lado em todos os momentos difíceis da faculdade, superamos obstáculos e desafios ao longo do caminho. Obrigada pela amizade dentro e fora da faculdade.

*“Se temos de esperar, que seja para colher a semente boa que lançamos hoje no solo da vida. Se for para semear, então que seja para produzir milhões de sorrisos, de solidariedade e amizade.” Cora Coralina.*

## RESUMO

Ferreira CM. Extrato glicólico de *Rosa centifolia* L.: atividade anti-inflamatória e antibiofilme sobre bactérias anaeróbias de interesse odontológico [trabalho de conclusão de curso]. São José dos Campos (SP): Universidade Estadual Paulista (Unesp), Instituto de Ciência e Tecnologia; 2022.

**Objetivo:** avaliar *in vitro* a atividade antimicrobiana e antibiofilme do extrato glicólico de *R. centifolia* L. sobre culturas planctônicas e biofilmes de *Prevotella intermedia* e *Parvimonas micra*, a citotoxicidade e a ação anti-inflamatória em macrófagos de camundongos (RAW 264.7) estimulados por lipopolissacarídeo (LPS) de *Escherichia coli*. **Material e métodos:** para verificação de atividade antimicrobiana do extrato sobre os microrganismos anaeróbios, foi aplicado teste de microdiluição, preconizado pelo *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI), norma M11-A7. As concentrações mais efetivas foram analisadas sobre biofilmes por 5 min e 24 h. Posteriormente, foi avaliada a citotoxicidade do extrato em linhagem RAW 264.7 por meio do ensaio colorimétrico MTT, e a ação anti-inflamatória foi verificada por ELISA, com quantificação de citocinas pró-inflamatórias (IL-1 $\beta$  e TNF- $\alpha$ ), após exposição dos macrófagos às concentrações mais efetivas. Os resultados foram analisados pelo teste de *Kruskal-Wallis* suplementado por *Dunn* considerando-se  $p \leq 0,05$ . **Resultados:** o extrato de *R. centifolia* L. não apresentou ação antimicrobiana para *P. intermedia* e *P. micra*. Após 24 h de tratamento, o extrato (100 mg/mL) reduziu a viabilidade do biofilme de *P. micra* em 65,24%. Sobre a ação citotóxica em macrófagos, o extrato não apresentou citotoxicidade nas concentrações 3-25 mg/mL após 5 min e 24 h de tratamento. Com relação a ação anti-inflamatória, não houve redução das citocinas pró-inflamatórias analisadas. **Conclusão:** conclui-se que o extrato de *R. centifolia* L. possui ação antibiofilme contra *P. micra* após 24h de tratamento. O efeito citotóxico do extrato em macrófagos foi dose-dependente e não possui atividade anti-inflamatória.

**Palavras-chave:** Atividade anti-inflamatória; Biofilme; *Parvimonas micra*; *Prevotella intermedia*; *Rosa centifolia* L.

## ABSTRACT

Ferreira CM. Glycolic extract of Rosa centifolia L.: anti-inflammatory and antibiofilm activity on anaerobic bacterias of dental interest [graduation final work]. São José dos Campos (SP): São Paulo State University (Unesp), Institute of Science and Technology; 2022.

**Objective:** to evaluate *in vitro* the antimicrobial and antibiofilm activity of the glycolic extract of Rosa centifolia L. on planktonic cultures and biofilms of Prevotella intermedia and Parvimonas micra, the cytotoxicity and the anti-inflammatory action in mouse macrophages (RAW 264.7) stimulated by lipopolysaccharide (LPS) from Escherichia coli. **Material and methods:** to verify the antimicrobial activity of the extract on anaerobic microorganisms, a microdilution test, recommended by the Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI), standard M11-A7, was applied. The most effective concentrations were analyzed on biofilms for 5 min and 24 h. Subsequently, the cytotoxicity of the extract in RAW 264.7 strain was evaluated using the MTT colorimetric assay, and the anti-inflammatory action was verified by ELISA, with quantification of pro-inflammatory cytokines (IL-1 $\beta$  and TNF- $\alpha$ ), after exposure of the macrophages at the most effective concentrations. The results were analyzed using the Kruskal-Wallis test supplemented by Dunn, considering  $p \leq 0.05$ . **Results:** the extract of R. centifolia L. showed no antimicrobial action against P. intermedia and P. micra. After 24 h of treatment, the extract (100 mg/mL) reduced P. micra biofilm viability by 65.24%. Regarding the cytotoxic action on macrophages, the extract did not show cytotoxicity at concentrations of 3-25 mg/mL after 5 min and 24 h of treatment. Regarding the anti-inflammatory action, there was no reduction in the pro-inflammatory cytokines analyzed. **Conclusion:** it is concluded that the extract of R. centifolia L. has antibiofilm action against P. micra after 24h of treatment. The cytotoxic effect of the extract on macrophages was dose-dependent and it has no anti-inflammatory activity.

**Keywords:** Anti-inflammatory activity; Biofilm; Parvimonas micra; Prevotella intermedia; Rosa centifolia L.

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO .....</b>	<b>9</b>
<b>2 MATERIAL E MÉTODOS.....</b>	<b>12</b>
<b>2.1 Extrato vegetal.....</b>	<b>12</b>
<b>2.2 Atividade antimicrobiana do extrato.....</b>	<b>13</b>
<b>2.2.1 Microorganismos .....</b>	<b>13</b>
<b>2.2.2 Atividade antimicrobiana sobre planctônicos .....</b>	<b>13</b>
<b>2.2.3 Atividade antimicrobiana sobre biofilmes.....</b>	<b>14</b>
<b>2.3 Análise da citotoxicidade.....</b>	<b>15</b>
<b>2.3.1 Cultura celular .....</b>	<b>15</b>
<b>2.3.2 Exposição às concentrações do extrato .....</b>	<b>15</b>
<b>2.3.3 Teste de MTT.....</b>	<b>16</b>
<b>2.4 Atividade anti-inflamatória.....</b>	<b>17</b>
<b>2.4.1 Formação dos grupos experimentais .....</b>	<b>17</b>
<b>2.4.2 Teste imunoenzimático ELISA .....</b>	<b>17</b>
<b>2.5 Análise estatística .....</b>	<b>18</b>
<b>3 RESULTADOS.....</b>	<b>19</b>
<b>3.1 Atividade antimicrobiana sobre microrganismos planctônicos .....</b>	<b>19</b>
<b>3.2 Atividade antimicrobiana sobre biofilmes monotípicos .....</b>	<b>19</b>
<b>3.2.1 Prevotella intermedia .....</b>	<b>19</b>
<b>3.2.2 Parvimonas micra .....</b>	<b>21</b>
<b>3.3 Análise da citotoxicidade .....</b>	<b>23</b>
<b>3.4 Análise da atividade anti-inflamatória .....</b>	<b>24</b>
<b>4 DISCUSSÃO .....</b>	<b>25</b>
<b>5 CONCLUSÃO .....</b>	<b>28</b>
<b>REFERÊNCIAS.....</b>	<b>29</b>
<b>ANEXO.....</b>	<b>33</b>

## 1 INTRODUÇÃO

A periodontite consiste em um processo inflamatório crônico causado pela interação do biofilme dentário acumulado, no qual bactérias anaeróbias estão presentes, com as células do tecido periodontal do hospedeiro. Conseqüentemente, ocorre a perda das estruturas de suporte e sustentação dos dentes [1, 2]. Assim como a periodontite, a infecção endodôntica também é causada predominantemente por bactérias anaeróbias, no qual após a penetração dos microrganismos na polpa, ocorre a adesão e a formação do biofilme ao longo do canal radicular [3]. Os microrganismos de interesse odontológico apresentam muitos fatores de virulência, dentre esses, os biofilmes se destacam pela complexidade, já que abrigam uma estrutura de microrganismos em interação direta, cada vez mais resistentes às terapias convencionais e fortificando a patogenicidade da doença. Essa comunidade microbiana encontra-se envolta por uma matriz extracelular e aderida entre si a uma superfície [4,5]. Dentre os microrganismos de interesse odontológico que possuem a capacidade de formar biofilmes estão o *Parvimonas micra* e *Prevotella intermedia* [6].

*Parvimonas micra* anteriormente denominada *Peptostreptococcus (micromonas) micros*, é uma espécie de cocos Gram-positivos, anaeróbios obrigatórios e proteolíticas frequentemente encontrados na gengiva de indivíduos sadios e encontrado em maior número em indivíduos com periodontite [6]. Também é frequentemente isolada em abscessos apicais agudos [7]. Já o microrganismo *Prevotella intermedia* são bacilos Gram-negativos, anaeróbios obrigatórios produtores de betalactamases sendo um dos principais componentes da microbiota do sulco gengival e frequentemente isoladas de periodontites apicais [6]. Tal espécie também é comumente associada a infecções endodônticas sintomáticas [8]. Ainda, apresenta capacidade de invasão tecidual contribuindo para destruição dos tecidos sadios [6].

Estudos têm demonstrado que a presença de alguns patógenos da doença periodontal pode estar relacionada com diversas doenças sistêmicas. Com relação a *P. intermedia*, verificou-se que sua presença pode estar relacionada ao aumento do risco de infarto e do câncer bucal [9,10]. Piñon-Esteban et al. [9] encontraram o DNA desse patógeno no material trombótico de pacientes com intervenção coronariana e Zhang et al. [10] verificaram que esta foi uma das espécies que apresentou aumento

quantitativo em sítios tumorais em pacientes com carcinoma de células escamosas na mucosa oral.

Com relação *P. micra*, cronologicamente pode-se verificar uma mudança nos achados científicos. Holger Bartz et al. [11] e Özok et al. [12] afirmaram que esse microrganismo é “raramente encontrado em infecções em outras partes do corpo”. Contudo, nos últimos anos, houve uma alta considerável no número de estudos encontrados na literatura sobre infecções sistêmicas correlacionadas com *P. micra* como por exemplo a espondilodiscite (infecção na coluna vertebral). Uma revisão de literatura publicada em 2018 mostrou categoricamente que houve uma explosão de relatos de casos sobre tal correlação nos anos de 2014 e 2015 [13]. No ano de 2020, Durovic et al. [14] relataram uma série de seis casos dos quais cinco *P. micra* foi o único patógeno isolado da infecção na coluna. Ainda, casos de abscessos cerebrais [15] e pulmonar [16] causados por *P. micra* também foram relatados. Bactérias resistentes aos antibióticos e antissépticos bucais têm surgido e a eficácia das substâncias antimicrobianas empregadas no tratamento das infecções bucais tem diminuído [17]. A emergência das descobertas de possíveis associações desses microrganismos anaeróbios com doenças sistêmicas fomenta ainda mais a busca por um tratamento eficaz.

Com isso, torna-se necessária a busca por métodos alternativos para serem utilizados em associação ao tratamento periodontal e a instrumentação endodôntica. Nesse enfoque, o uso de produtos naturais pode ser uma alternativa promissora para atuar de forma conjunta no tratamento das infecções bucais, visto que, nos últimos anos, o número de pesquisas relacionadas à medicina fitoterápica aumentou [18]. A utilização de plantas medicinais é uma prática antiga, tendo registros desde a época dos egípcios e também é tradição, por exemplo, em tribos indígenas [19].

Dentre as plantas utilizadas, destaca-se a *Rosa centifolia* L., conhecida como rosa branca, essa planta possui origem asiática e é cultivada desde a antiguidade. Possui atividade anti-inflamatória, antisséptica, cicatrizante, anticolagenase, antielastase e antioxidante e atua em condições de artrite, asma, bronquite, feridas, úlceras, dores de cabeça e dores musculares [20-23].

Em relação a sua composição, observa-se a presença de aproximadamente noventa e cinco componentes em seu óleo essencial, como terpenos, glicosídeos, flavonóides e antocianinas [24]. Estudos abordando o extrato de *Rosa centifolia* L. são

escassos na literatura, entretanto, comparações foram realizadas entre a atividade antimicrobiana do extrato de *Rosa damascena*, que pertence à mesma família do composto abordado. Dentre quarenta e dois óleos naturais testados, o óleo essencial de *Rosa damascena* foi selecionado como um dos quatro óleos com maior atividade inibitória significativa no *quorum sensing* de *Pseudomonas aeruginosa* [25].

A atividade antimicrobiana do extrato de *Rosa damascena* também foi comparada as soluções irrigadoras comumente utilizadas para tratamento de infecções endodônticas (hipoclorito de sódio e clorexidina). Os autores concluem que todas as soluções foram capazes de matar todos os microrganismos após 1 minuto de contato [26].

Uma solução preparada a partir das flores de *Rosa damascena* foi avaliada quanto a atividade antimicrobiana sobre *Candida albicans* e *Staphylococcus aureus* resistente à metilina (MRSA) e quanto à capacidade modulatória sobre neutrófilos. A substância conhecida como “água de rosas” foi capaz de reduzir a patogenicidade dos microrganismos e atenuar a estimulação de neutrófilos [27].

Em relação a espécie *Rosa centifolia* L., o potencial anti-inflamatório do extrato aquoso e do extrato alcoólico foi analisado em ratos com processo inflamatório induzido por carragenina e ambas as apresentações do extrato vegetal foram capazes de controlar a inflamação. O extrato aquoso inibiu citocinas pró-inflamatórias como TNF- $\alpha$ , IL - 1 $\beta$  e IL - 6 e o extrato alcoólico ainda foi avaliado quanto ao seu potencial para combater a artrite, induzida pelo método adjuvante completo de Freund e os resultados revelaram-se promissores [22,23]. Os autores relatam que os resultados são semelhantes a outros encontrados na literatura com relação a atividade anti-inflamatória de outras espécies do gênero *Rosa* como *Rosa damascena* e *Rosa canina* [28,29]. Além disso, Galal et al. [35] estudaram os fitoquímicos de poda de *Rosa damascena* e sua possibilidade de uso como fitomedicina, sendo considerados moderadamente eficazes contra *Aspergillus fumigatus* e *Candida albicans*, *Bacillus subtilis*, *Escherichia coli* e *Proteus vulgaris*. Dessa maneira, foi constatado que os resíduos desse composto poderiam ser usados para uma variedade de propósitos médicos.

Os estudos sobre ação antimicrobiana do extrato de *Rosa centifolia* L. são escassos na literatura e há poucos relatos sobre a atividade anti-inflamatória do mesmo. Outras espécies do gênero *Rosa* têm sido avaliadas e apresentam resultados

promissores quanto as atividades biológicas sobre microrganismos e células. Investigar o potencial de novos extratos vegetais conduz o grupo de estudos a maturidade científica, uma vez que, a associação de extratos populares aos menos conhecidos podem promover resultados surpreendentes.

Como supracitado, é de suma importância avaliar novas opções de tratamento para as espécies anaeróbias como *P. intermedia* e *P. micra*, microrganismos patogênicos responsáveis pela colonização da cavidade oral. Além de tais bactérias estarem comprovadamente relacionadas as infecções bucais, a recente descoberta sobre a possível correlação da presença de *P. intermedia* e *P. micra* com problemas de saúde sistêmicos fomenta ainda mais essa busca por terapias alternativas eficientes, como a investigação farmacológica dos produtos naturais, impulsionado o desenvolvimento científico nessa área.

Diante da grande diversidade de plantas, *R. centifolia* L. tem um potencial inexplorado para ser utilizado em formulações de interesse odontológico, assim, este estudo teve como objetivo avaliar *in vitro* a atividade antimicrobiana e antibiofilme do extrato glicólico de *R. centifolia* L. sobre culturas planctônicas e biofilmes de *Prevotella intermedia* e *Parvimonas micra*, a citotoxicidade em macrófagos de camundongos (RAW 264.7), e a ação anti-inflamatória em cultura de RAW 264.7 estimulados por lipopolissacarídeo (LPS) de *Escherichia coli*.

## 2 MATERIAL E MÉTODOS

### 2.1 Extrato vegetal

O extrato glicólico de *R. centifolia* L. (rosas brancas) foi adquirido na concentração de 20% (200 mg/mL) em propilenoglicol (Mapric, SP). O extrato foi obtido utilizando-se flores de *R. centifolia* L. O informativo técnico do extrato encontra-se no Anexo A.

## 2.2 Atividade antimicrobiana do extrato

### 2.2.1 Microrganismos

A avaliação da atividade antimicrobiana do extrato foi avaliada sobre cepas de referência (ATCC - *American Type Culture Collection*) de *Prevotella intermedia* (ATCC 33563) e *Parvimonas micra* (ATCC 33270) provenientes do Laboratório de Anaeróbios (LANA) do ICT – UNESP.

### 2.2.2 Atividade antimicrobiana sobre planctônicos

A avaliação sobre planctônicos foi baseada no *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI), norma M11-A7. Em placas de 96 poços, foram adicionados 100 µL/poço de caldo *Brucella* (Himedia, Mumbai, Índia) enriquecido com sangue de carneiro desfibrinado (5%) (New Prov, Pinhais, Brasil), Hemina (1%) (Merck, Darmstadt, Alemanha) e Menadiona (1%) (Merck, Darmstadt, Alemanha), e no primeiro poço de cada coluna 100 µL do extrato, iniciando uma série de 10 diluições seriadas (quadro 1). Foram adicionadas alíquotas de 10 µL/poço de suspensão bacteriana preparada em solução fisiológica estéril (0,9% de NaCl) e padronizada na escala 0,5 de *McFarland* e correspondente a concentração de  $1,5 \times 10^8$  UFC/mL seguida, o conjunto foi levado para incubação em anaerobiose (37°C/48 h). Como controle, foi utilizado 100 µL de caldo *Brucella* e 100 µL de suspensão bacteriana. A Concentração Inibitória Mínima (CIM) foi determinada no primeiro poço visualmente límpido e a Concentração Bactericida Mínima (CBM) foi determinada como a menor concentração do extrato capaz de inibir o crescimento bacteriano. Para isso, alíquotas de 20 µL de cada poço foram inoculadas em ágar *Brucella* por meio da técnica da gota e incubadas (37°C / 7 dias) em anaerobiose. Após período de incubação, em placas que não foi observado crescimento de colônias, foi determinada a CBM do extrato para cada cepa bacteriana. Com base nestes resultados, foi realizada a atividade

antibiofilme do extrato vegetal, com as concentrações determinadas previamente.

**Quadro 1** – Teste de microdiluição em caldo, concentração do extrato de *Rosa centifolia* L. em cada poço expressos em mg/mL

Concentração do extrato de <i>R. centifolia</i> L. (microdiluição seriada)										
Poços	1º	2º	3º	4º	5º	6º	7º	8º	9º	10º
Extrato (mg/mL)	50	25	12,5	6,25	3,12	1,56	0,78	0,39	0,19	0,09

Fonte: Elaborado pela autora.

### 2.2.3 Atividade antimicrobiana sobre biofilmes

As bactérias foram cultivadas em meio sólido (ágar *Brucella*) e incubadas em anaerobiose (37°C/48 h). Em seguida, foram preparadas suspensões microbianas em solução fisiológica estéril e padronizadas na escala 0,5 de *McFarland*. Aliquotas da suspensão foram adicionadas (100 µL/poço) em placas de 96 poços acrescido de 100 µL de caldo *Brucella* enriquecido. A placa foi levada para incubação (37°C/ 7 dias em anaerobiose) com troca do meio de cultura a cada 48 h. A seguir, o biofilme foi lavado (0,9% de NaCl) e exposto a diferentes concentrações do extrato previamente selecionadas no teste de microdiluição em caldo com diferentes tempos de contato (5 min e 24 h). Como controles, foram utilizados solução salina (5 min) e salina/meio de cultura (24 h) e solução de clorexidina 0,12% (n=12). Após os tratamentos com extrato e duas lavagens com solução salina, foi realizado o teste de viabilidade celular da bactéria em que foram adicionados 100 µL da solução de MTT (3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-Diphenyltetrazolium Bromide) em cada poço e a placa foi incubada ao abrigo da luz a 37 °C durante 1 hora. A solução de MTT foi removida e foram adicionados 100 µL de dimetilsulfóxido (DMSO - Sigma Aldrich). Uma nova incubação foi feita ao abrigo da luz por 10 min em *shaker* e 10 min em estufa a 37 °C. A leitura foi realizada em espectrofotômetro com 570 nm e as densidades ópticas (DO)

foram convertidas em redução de viabilidade celular por meio da fórmula: % Redução de Viabilidade =  $100 - (\text{DO Poço Tratado} \times 100 / \text{Média de DO Controle Negativo})$ .

## 2.3 Análise de citotoxicidade

### 2.3.1 Cultura celular

Foram utilizados macrófagos de camundongo (RAW 264.7) provenientes do Banco de Células do Rio de Janeiro - Associação Técnico Científica *Paul Ehrlich* (APABCAM, Rio de Janeiro, Brasil), cultivados em meio de Eagle modificado por Dulbecco (DMEM - LGC Biotecnologia, Cotia, Brasil) suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB - Invitrogen, Nova York, EUA) e 1% de penicilina-estreptomicina (Gibco, Grand Island, NY, United States) e mantidos em frascos de cultivo celular (TPP, Suíça) sob incubação (37°C e CO<sub>2</sub> 5%) e umidade atmosférica. Após subconfluência, RAW 264.7 foi despreendida com varredor celular (TPP) e após centrifugação (3000 rpm/5 min) desta suspensão celular o sobrenadante foi descartado e o *pellet* suspenso em meio fresco. Com o teste de exclusão por azul de Trypan (0,5%, Sigma-Aldrich) foram quantificadas as células viáveis. Com isso, em placas de 96 poços foram adicionadas 200 µL/poço de DMEM contendo  $4 \times 10^4$  células viáveis e seguiram para incubação por 24 h.

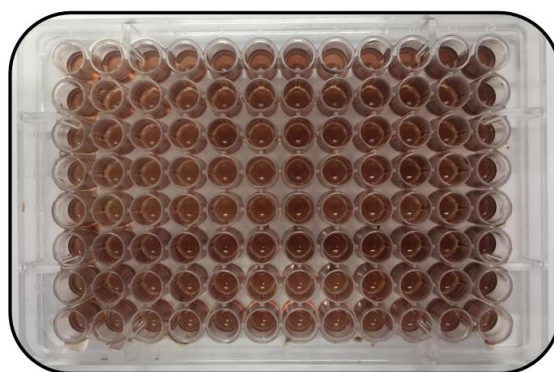
### 2.3.2 Exposição às concentrações do extrato

O extrato de *R. centifolia* L. foi diluído de forma seriada em meio de cultura

DMEM para obter diferentes concentrações (0,3-100 mg/mL). O meio de cultura (DMEM) foi utilizado como controle negativo, sendo  $n = 10$ /grupo experimental. Com isso, a cultura foi exposta a cada concentração do extrato por 5 min ou 24 h. Para descarte de células que não sobreviveram ao tratamento foram feitas lavagens com PBS (Tampão fosfato-salino).

### 2.3.3 Teste de MTT

A solução de MTT [brometo de 3(4,5-dimetiltiazol-2-yl)2,5difeniltetrazólio] (Sigma Aldrich) foi preparada com suspensão do pó de MTT em PBS na concentração de 0,5 mg/mL. Foram adicionados 100  $\mu$ L/poço e após incubação de 4 h, sob abrigo da luz, o sobrenadante foi descartado e adicionado 100  $\mu$ L/poço de dimetilsulfóxido (DMSO - Sigma Aldrich). Nova incubação de 10 min foi realizada e após agitação da placa em *shaker*, por mais 10 min, foi determinada a absorbância dos poços com auxílio de espectrofotômetro de microplacas (Bio-Tek, Vermont, EUA) a 570 nm. Os dados gerados foram convertidos em percentual de viabilidade celular.



**Figura 1** – Solução de MTT colocada em contato com as células para análise de citotoxicidade.  
Fonte: Elaborado pela autora.

## 2.4 Atividade anti-inflamatória

### 2.4.1 Formação dos grupos experimentais

Em placas de 24 poços foram acrescentados  $5 \times 10^5$  células viáveis/mL em cada poço. As placas foram incubadas (37°C e CO<sub>2</sub> 5%) por 24 h para aderência das células. Após, o meio foi removido e adicionado meio de cultura suplementado com extrato de *R. centifolia* L., em diferentes concentrações (6,2 e 12 mg/mL). Adicionalmente, foram incluídas as situações de ausência e presença de LPS (1 µg/mL) de *E. coli* no meio suplementado com extrato vegetal. DMEM foi utilizado como controle negativo em ambas situações. Para cada grupo experimental foi utilizado n = 10. Em seguida, as placas seguiram para incubação por 24 h e os sobrenadantes de todos os grupos foram coletados, armazenados em microtubos e congelados em freezer (-20°C) para posterior quantificação de IL-1β e TNF-α pelo teste imunoenzimático ELISA.

### 2.4.2 Teste imunoenzimático ELISA

Foram utilizados Kits comerciais DuoSet ELISA Development System para IL-1β e para TNF-α (R & D Systems, Minneapolis, EUA). Após diluição do anticorpo de captura anti-IL-1β ou anti-TNF-α em PBS, foram adicionados 100 µL/poço em microplacas para teste ELISA (GreinerBioOne, Bélgica) e deixadas em temperatura ambiente, *overnight*, protegidas por filme plástico. Posteriormente, os poços passaram por processo de lavagem que consistiu na remoção do sobrenadante e adição de 300 µL de Tampão de Lavagem (PBS acrescido de 0,05% de *Tween* 20), por três vezes consecutivas. Após, foram adicionados 300 µL/poço de Tampão de Bloqueio (PBS

acrescido de 0,1% de Soro Albumina Bovino - BSA). As placas foram deixadas em temperatura ambiente por uma hora. Após procedimentos de lavagem, foram adicionados nas placas 100  $\mu$ L do padrão de citocinas (curva-padrão) e 100  $\mu$ L dos sobrenadantes celulares obtidos após exposição ao extrato vegetal. Após duas horas de incubação em temperatura ambiente, os procedimentos de lavagem foram realizados e posteriormente foram acrescentados 100  $\mu$ L/poço de anticorpo de detecção (anti-IL-1 $\beta$  ou anti-TNF  $\alpha$ ) marcados com biotina. As placas foram mantidas em temperatura ambiente por duas horas. Novas lavagens foram feitas e após foram adicionados 100  $\mu$ L/poço de estreptavidina conjugada com enzima peroxidase. Sobre proteção da luz, as placas foram incubadas em temperatura ambiente por 20 min. Após os procedimentos de lavagem, foram adicionados 100  $\mu$ L/poço da solução de substrato cromogênico, composto por Reagente A (peróxido de hidrogênio) e Reagente B (tetrametilbenzidina) na proporção de 1:1. As placas foram incubadas, abrigadas da luz, à temperatura ambiente por 20 min. Logo após, foram adicionados 50  $\mu$ L da Solução de Parada (ácido sulfúrico 2N) e as placas foram imediatamente levadas ao leitor de microplacas, e suas absorbâncias foram lidas no comprimento de onda de 450 nm. Após obtenção das DO foram determinados os níveis de IL-1 $\beta$  e TNF- $\alpha$  (pg/mL) das amostras de sobrenadantes celulares com auxílio do programa *GraphPad Prism 5.0*.

## 2.5 Análise estatística

Os dados com distribuição normal foram analisados pelo teste ANOVA suplementado pelo teste de *Tukey* ( $p \leq 0,05$ ), e os que não apresentaram normalidade foram analisados pelo teste *Kruskal-Wallis* suplementado por *Dunn*. Em todos os testes foi utilizado o programa *GraphPad Prism 5.0*, considerando-se o nível de significância de  $p \leq 0,05$ .

## 3 RESULTADOS

### 3.1 Atividade antimicrobiana sobre microrganismos planctônicos

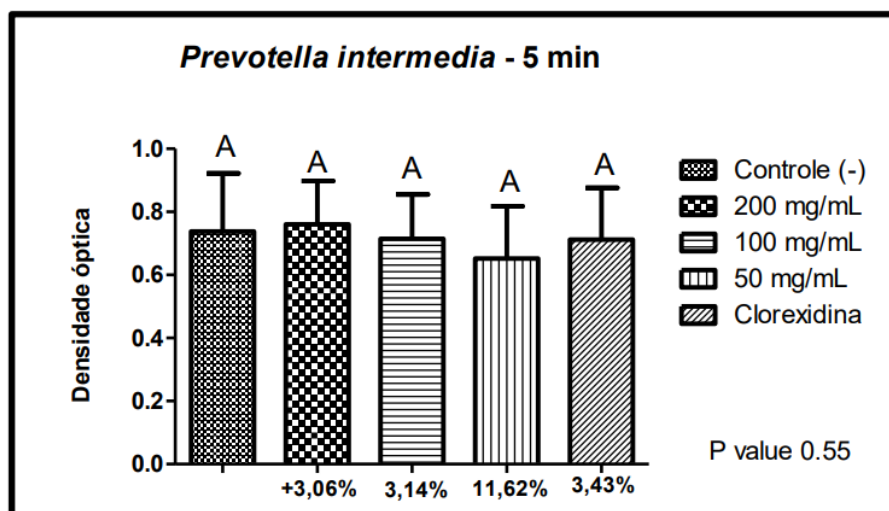
Não foi possível obter a CIM do extrato devido a turbidez, impossibilitando a leitura visual dos resultados. Com relação a CBM, as concentrações mais altas do extrato glicólico de *R. centifolia* L. não apresentaram ação microbicide uma vez que houve crescimento de colônias em todas as concentrações avaliadas.

### 3.2 Atividade antimicrobiana sobre biofilmes monotípicos

Foram utilizadas para o teste em biofilmes as concentrações de 200 (extrato puro), 100 e 50 mg/mL para os tratamentos de 5 min e de 100, 50 e 25 mg/mL para os tratamentos de 24 h, visto que a CBM não foi definida para nenhuma cepa. As concentrações utilizadas para o tratamento de 24 h foram menores pois, por conta da incubação de longo período, seria necessário fornecer nutrientes (meio de cultura) aos microrganismos de forma a evitar esta interferência nos testes, impossibilitando a utilização de extrato puro (200 mg/mL).

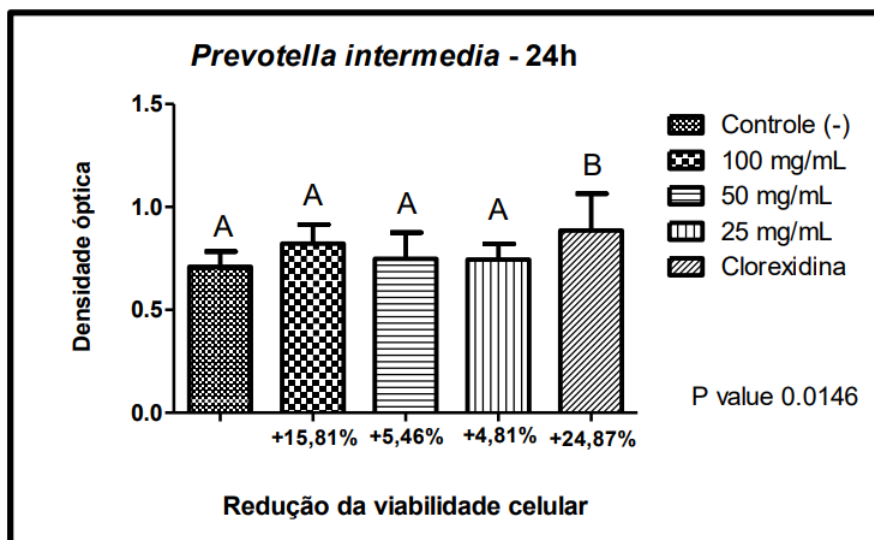
#### 3.2.1 *Prevotella intermedia*

Pode-se verificar que no tratamento por 5 min do extrato de *Rosa centifolia* L. sobre *P. intermedia* houve uma redução do biofilme de 3,14% e 11,62% nas concentrações de 100 e 50 mg/mL respectivamente. O grupo tratado com clorexidina 0,12% sofreu uma redução de 3,43%. Quando tais grupos foram comparados ao controle, não houve diferença estatística significativa ( $P > 0,05$ ).



**Figura 2** - Atividade antibiofilme do extrato de *R. centifolia* L. sobre *P. intermedia* após tratamento de 5 min. Os gráficos demonstram as densidades ópticas obtidas em leitura de teste MTT com os tratamentos com salina (controle negativo), extrato de rosas brancas nas concentrações de 200, 100 e 50 mg/mL e clorexidina 0,12% (controle positivo). As letras diferentes demonstram diferença estatisticamente significativa entre os grupos. Dados com distribuição normal analisados pelo teste ANOVA suplementado pelo teste de *Tukey* ( $p \leq 0,05$ ).  
Fonte: Elaborado pela autora.

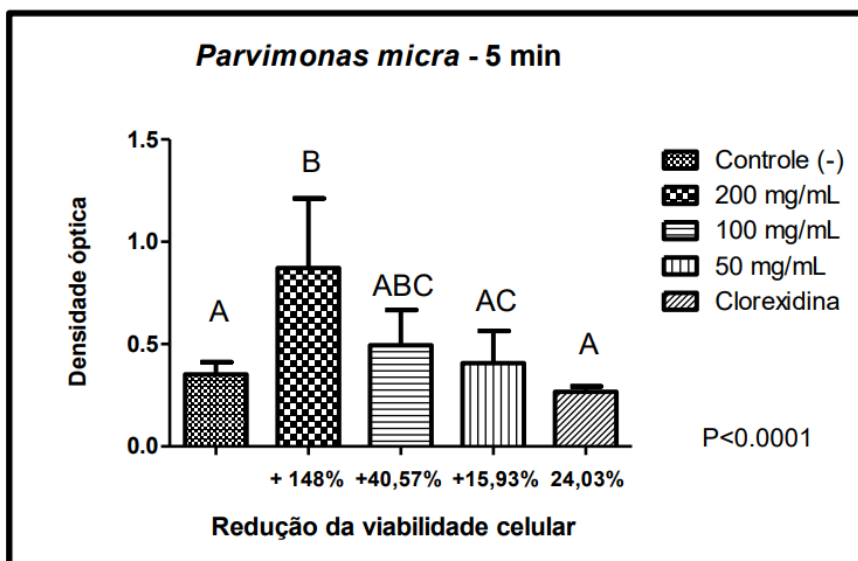
Quando os grupos experimentais foram comparados ao grupo controle na análise do tempo de contato de 24 h sobre *P. intermedia*, também não houve diferença estatística significativa ( $P > 0,05$ ). Apenas o grupo que foi tratado com clorexidina 0,12% sofreu um aumento da viabilidade celular significativo de 24,87% diferindo estatisticamente em relação ao grupo controle ( $P < 0,05$ ).



**Figura 3** - Atividade antibiofilme do extrato de *R. centifolia* L. sobre *P. intermedia* após tratamento de 24 h. Os gráficos demonstram as densidades ópticas obtidas em leitura de teste MTT com os tratamentos com salina/caldo Brucella (controle negativo), extrato de rosas brancas nas concentrações de 100, 50 e 25 mg/mL e clorexidina 0,12% (controle positivo). As letras diferentes demonstram diferença estatisticamente significativa entre os grupos. Dados com distribuição normal analisados pelo teste ANOVA suplementado pelo teste de *Tukey* ( $p \leq 0,05$ ).  
Fonte: Elaborado pela autora.

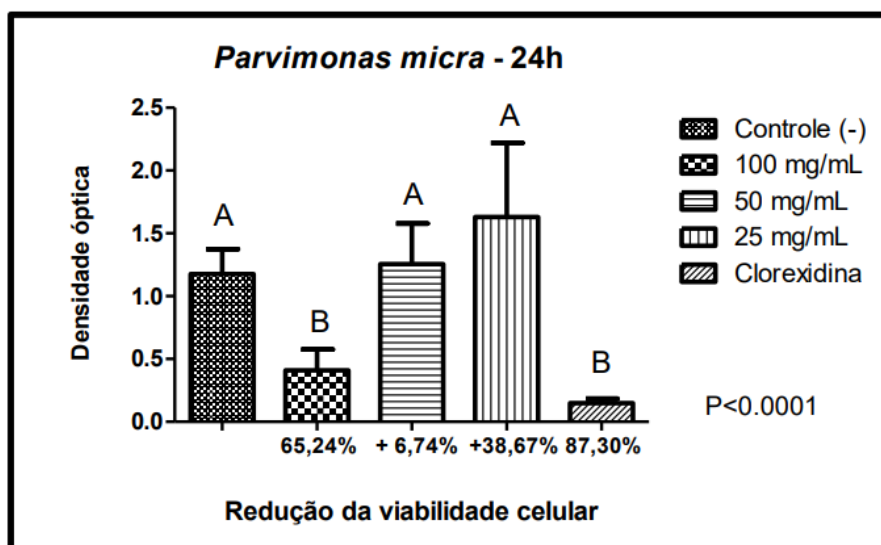
### 3.2.2 *Parvimonas micra*

Sobre biofilme de *P. micra* no tempo de contato de 5 min, houve um aumento da viabilidade celular no grupo tratado com 200 mg/mL do extrato vegetal diferindo estatisticamente do grupo controle negativo. Apenas o grupo tratado com clorexidina 0,12% houve uma redução da viabilidade de 24,03%, porém sem diferença estatística significativa quando comparado ao controle ( $P > 0,05$ ).



**Figura 4** - Atividade antibiofilme do extrato de *R. centifolia* L. sobre *P. micra* após tratamento de 5 min. Os gráficos demonstram as densidades ópticas obtidas em leitura de teste MTT com os tratamentos com salina (controle negativo), extrato de rosas brancas nas concentrações de 200, 100 e 50 mg/mL e clorexidina 0,12% (controle positivo). As letras diferentes demonstram diferença estatisticamente significativa entre os grupos. Dados com distribuição normal analisados pelo teste ANOVA suplementado pelo teste de *Tukey* ( $p \leq 0,05$ ).  
Fonte: Elaborado pela autora.

Na análise do tempo de contato de 24 h, houve uma redução de 65,24% da viabilidade celular do grupo tratado com 100 mg/mL do produto vegetal diferindo estatisticamente do grupo controle negativo ( $P < 0,05$ ). O grupo tratado com clorexidina sofreu uma redução de 87,30% quando comparado ao grupo controle o que também promoveu uma diferença estatística significativa.

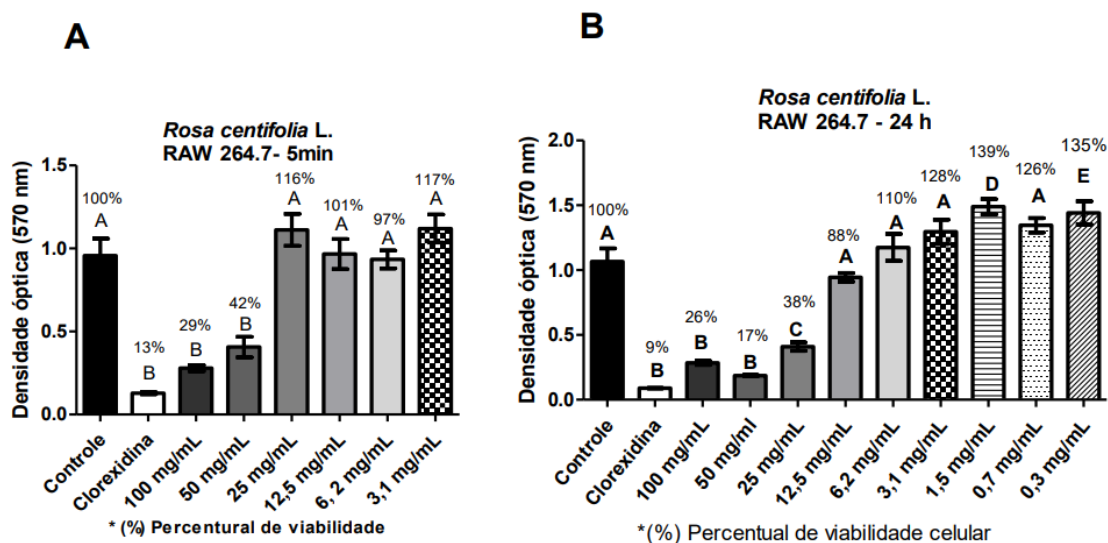


**Figura 5** – Atividade antibiofilme do extrato de *R. centifolia* L. sobre *P. micra* após tratamento de 24 h. Legenda: Os gráficos demonstram as densidades ópticas obtidas em leitura de teste MTT com os tratamentos com salina/caldo *Brucella* (controle negativo), extrato de rosas brancas nas concentrações de 100, 50 e 25 mg/mL e clorexidina 0,12% (controle positivo). As letras diferentes demonstram diferença estatisticamente significativa entre os grupos. Dados com distribuição normal analisados pelo teste ANOVA suplementado pelo teste de *Tukey* ( $p \leq 0,05$ ).

Fonte: Elaborado pela autora.

### 3.3 Análise de citotoxicidade

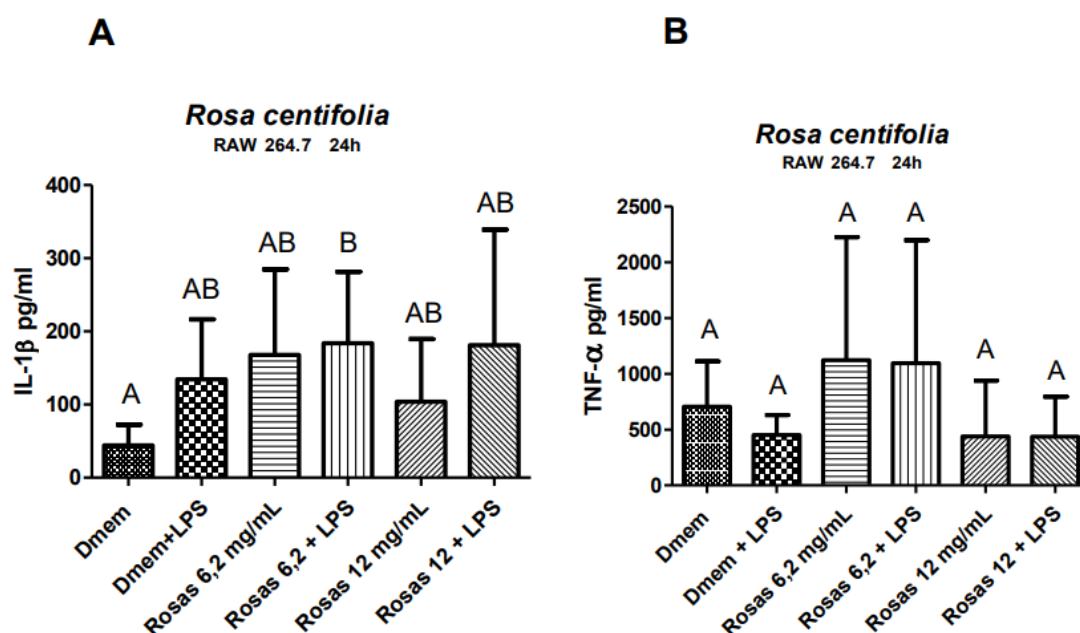
Com 5 min de tratamento, o extrato de *R. centifolia* L. não demonstrou ação citotóxica em células da linhagem RAW 264.7 (Macrófagos) nas concentrações 3-25 mg/mL (figura 6A), considerando toxicidade celular abaixo de 75 % de viabilidade. Após 24 h de exposição ao extrato, foi observado que as concentrações 0,3-12 mg/mL não reduziram a porcentagem de células viáveis, portanto, não apresentaram ação citotóxica (figura 6B).



**Figura 6** - Avaliação da viabilidade de macrófagos (RAW 264.7) pelo teste de MTT após exposição ao extrato *R. centifolia L.* em diferentes concentrações. Avaliação da viabilidade após exposição das células ao extrato no período de 5 min e 24 h (figuras 6A e 6B, respectivamente). Dados com distribuição normal analisados pelo teste ANOVA suplementado pelo teste de *Tukey* ( $p \leq 0,05$ ). Fonte: Elaborado pela autora.

### 3.4 Análise da atividade anti-inflamatória

Com relação a análise da citocina pró-inflamatória IL-1 $\beta$ , não houve diferença estatística quando comparado os grupos que receberam somente extrato de *R. centifolia L.* (6,2 e 12 mg/mL) com o grupo que recebeu somente DMEM (controle negativo). Dos grupos que receberam o extrato associado ao LPS houve uma diferença quando comparada a concentração de 6,2 mg/mL+LPS ao grupo controle positivo (DMEM+LPS). O extrato de *R. centifolia L.* não promoveu a redução da citocina TNF- $\alpha$  uma vez que os grupos que contaram somente com as concentrações de 6,2 e 12 mg/mL do extrato exibiram a produção de TNF- $\alpha$  semelhantes aos grupos que receberam as concentrações do extrato associado ao LPS e por sua vez tais grupos foram semelhantes ao controle positivo, conforme demonstrado na figura 7B.



**Figura 7** - Quantificação das citocinas pró-inflamatórias IL-1 $\beta$  e TNF- $\alpha$  após contato com extrato vegetal no período de 24 h (figuras 7A e 7B, respectivamente). Dados analisados pelo teste *Kruskall Wallis* suplementado pelo teste de *Dunn* ( $p \leq 0,05$ ).

Fonte: Elaborado pela autora.

## 4 DISCUSSÃO

No presente estudo, o extrato analisado não apresentou redução significativa sobre os microrganismos anaeróbios no tempo de contato de 5 min. Sobre *P. micra* pode-se verificar resultados mais promissores quando os biofilmes foram tratados por 24 h, reduzindo a viabilidade em 65,24% do grupo tratado com 100 mg/mL do produto vegetal, diferindo estatisticamente do grupo controle e atuando de forma semelhante a clorexidina.

Com relação aos relatos da ação antimicrobiana de *Rosa centifolia* L. na literatura, estes são escassos e por isso a importância do presente estudo. Entretanto, existem pesquisas sobre o gênero *Rosa* (rosácea), dentre eles da *Rosa damascena* [27,30,31]. Nesse enfoque, Akram et al. [30] realizaram estudos a fim de obter informações atualizadas e completas sobre os efeitos farmacológicos para o uso medicinal da planta. Com isso, constataram que o extrato de *Rosa damascena* possui um amplo espectro de atividade antimicrobiana contra inúmeras espécies de bactérias

gram-positivas e gram-negativas, enquanto que seu óleo absoluto e essencial possui atividade contra *Erwinia carotovora*, *Staphylococcus aureus*, cepas de *Chromobacterium violaceum*, *Bacillus subtilis*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Escherichia coli*.

Outros estudos realizados sobre novas estratégias para o tratamento da infecção pelo HIV também levaram em conta a atuação antimicrobiana da *Rosa damascena*. Os extratos dessa planta inibiram cepas de HIV-1 adaptadas em laboratório, além de demonstrar ser atóxico para células epiteliais HEC-1A [31]. Além disso, uma solução preparada a partir das flores de *Rosa damascena* foi avaliada quanto a atividade antimicrobiana sobre *Candida albicans* e *Staphylococcus aureus* resistente à metilina (MRSA) e quanto à capacidade modulatória sobre neutrófilos. A substância foi capaz de reduzir a patogenicidade dos microrganismos através da inibição do crescimento com a concentração inibitória mínima de 50%, além de atenuar a estimulação de neutrófilos [27]. Com isso, pode-se observar que os resultados do presente estudo vão de encontro com os estudos supracitados relacionando a *Rosa damascena* com relação aos efeitos antimicrobianos. Não foram encontrados estudos na literatura consultada em relação ao extrato de *Rosa centifolia* L. tornando-se cada vez mais essencial as pesquisas nesse enfoque.

Em algumas concentrações do extrato vegetal houve um aumento da viabilidade celular. Não foram encontrados estudos na literatura que pudessem esclarecer tais achados. O extrato utilizado no presente estudo foi glicólico e tal veículo possui uma consistência viscosa o que pode ter auxiliado na aderência dos microrganismos no fundo da placa de acrílico. Tal hipótese poderia explicar esse aumento da viabilidade celular, uma vez que o mecanismo de aderência foi potencializado, os procedimentos de lavagem que antecedem a leitura da densidade óptica não seriam suficientes para desprender o biofilme formado.

No presente estudo, o extrato analisado não apresentou citotoxicidade em células de macrófagos da linhagem RAW 264.7 nas concentrações 3-25 mg/mL, considerando toxicidade celular abaixo de 75 % de viabilidade. Após 24 h de exposição ao extrato, foi observado que as concentrações 0,3-12 mg/mL não reduziram a porcentagem de células viáveis, portanto, não apresentaram ação citotóxica. Esses achados mostraram que a citotoxicidade está relacionada ao aumento da concentração do extrato, ou seja, é dose-dependente. Sukumaran et al.

[36] avaliou o efeito citotóxico da clorexidina (0,1%), e observou uma viabilidade média de 40% com 4 min de exposição aos fibroblastos. Em nosso estudo, o percentual de viabilidade celular dos macrófagos foi de 13% e 9% após 5 min e 24h de contato, demonstrando a ação citotóxica da clorexidina. Não foram encontrados estudos na literatura que avaliassem o extrato de *Rosa centifolia* L. em macrófagos (RAW 264.7), contudo, outros modelos animais foram utilizados para avaliar a toxicidade do extrato vegetal de *Rosa damascena*, que confirmam a mesma hipótese. Dentre esses estudos, foram realizados testes de toxicidade de doses de extratos vegetais contendo *Rosa damascena* em camundongos albinos. Nenhum sinal e sintoma de toxicidade, dentre eles hiperatividade, sedação ou mortalidade, puderam ser observados nos grupos de tratamento [32].

Com relação a ação anti-inflamatória, verificou-se que as concentrações do extrato vegetal não apresentaram redução das citocinas pró-inflamatórias analisadas. Contudo, também não houve diferença estatística quando comparado todos os grupos experimentais ao grupo controle negativo (DMEM). A avaliação da ação anti-inflamatória de *Rosa centifolia* L. é bem descrita na literatura. Estudos importantes avaliaram a atividade anti-inflamatória dessa planta em modelo de edema de pata induzido por carragenina em ratos através da preparação de bochechos e gel a partir do óleo da Rosa. Verificou-se que a expressão dos mediadores pró-inflamatórios TNF- $\alpha$ , IL-6 e IL-1 $\beta$  foi menor no grupo tratado com *Rosa centifolia* do que nos de controles, sugerindo assim um grande potencial anti-inflamatório do extrato [23,33].

Ainda sobre o efeito anti-inflamatório, se tratando, porém, da *Rosa damascena*, óleos essenciais foram considerados por meio da avaliação de parâmetros antioxidantes de estresse oxidativo e da expressão do gene inflamatório da ciclooxigenase-2 no dano hepático causado pela sepse de ratos. Demonstrou-se que o tratamento com óleo essencial de *Rosa damascena* foi eficaz devido a efeitos antioxidantes, incluindo parâmetros inflamatórios, úteis para prevenir essas lesões [34]. Além disso, informações sobre efeitos farmacológicos de *Rosa damascena* foram coletados de bancos de dados e verificou-se um amplo espectro de atividades farmacológicas, dentre elas a ação anti-inflamatória, tendo um lugar importante no sistema de medicina [30].

Foi comprovado no estudo uma redução do biofilme de bactérias anaeróbias presentes em infecções bucais com a utilização do extrato de *R. centifolia* L. e

principalmente sua segurança de uso por meio da análise de citotoxicidade, embora não tenha existido sucesso na redução das citocinas pró-inflamatórias analisadas. Esta planta medicinal tem grande probabilidade de ser um agente terapêutico promissor para utilizar-se nas mais variadas formulações com diversos fins.

## 5 CONCLUSÃO

O extrato glicólico de *R. centifolia* L. não apresentou ação bactericida para *P. intermedia* e *P. micra*. A ação antibiofilme foi demonstrada apenas para *P. micra*, com tempo de contato de 24h, reduzindo a viabilidade em 65,24% na concentração de 100 mg/mL. O efeito citotóxico do extrato em macrófagos foi dose-dependente. Com relação a ação anti-inflamatória, não houve redução das citocinas pró-inflamatórias avaliadas.

## REFERÊNCIAS

1. Zhang R, Yang J, Wu J, Sun WB, Liu Y. Effect of deletion of the *rgpA* gene on selected virulence of *Porphyromonas gingivalis*. *J Dent Sci*. 2016 Sep;11(3):279-286.
2. Kinane DF, Stathopoulou PG, Papapanou PN. Periodontal diseases. *Nat Rev Dis Primers*. 2017 Jun 22;3:17038. doi: 10.1038/nrdp.2017.38. PMID: 28805207
3. Francisco PA. Panorama do biofilme nas infecções endodônticas [TCC especialização]. Piracicaba (SP): Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Odontologia de Piracicaba. 2017.
4. Salehi B, Kregiel D, Mahady G, Sharifi-Rad J, Martins N, Rodrigues CF. Management of *Streptococcus mutans*-*Candida* spp. Oral Biofilms' Infections: Paving the Way for Effective Clinical Interventions. *J Clin Med*. 2020 Feb 14;9(2):517. doi: 10.3390/jcm9020517. PMID: 32075040; PMCID: PMC7074106.
5. Polak D, Shany-Kdoshim S, Zaydel L, Feuerstein O, Houri-Haddad Y. High resolution novel method for tracking bacteria in a multi-species biofilm. *Arch Microbiol*. 2019 Mar;201(2):259-266. doi: 10.1007/s00203-018-1614-z. Epub 4. PubMed PMID: 30610246.
6. Jorge AOC. Microbiologia e imunologia oral. Rio de Janeiro: Elsevier; 2012. 369 p.
7. Siqueira JF Jr, Rôças IN. Microbiology and treatment of acute apical abscesses. *Clin Microbiol Rev*. 2013 Apr;26(2):255-73. doi: 10.1128/CMR.00082-12. PMID: 23554416; PMCID: PMC3623375.
8. Sakamoto M, Rôças IN, Siqueira JF Jr, Benno Y. Molecular analysis of bacteria in asymptomatic and symptomatic endodontic infections. *Oral Microbiol Immunol*. 2006 Apr;21(2):112-22. doi: 10.1111/j.1399-302X.2006.00270.x. PMID: 16476021.
9. Piñon-Esteban P, Núñez L, Moure R, Marrón-Liñares GM, Flores-Rios X, Aldama-Lopez G, et al. Presence of bacterial DNA in thrombotic material of patients with myocardial infarction. *Sci Rep*. 2020;10(1):16299. Published 2020 Oct 1. doi:10.1038/s41598-020-73011-5.
10. Zhang L, Liu Y, Zheng HJ, Zhang CP. The Oral Microbiota May Have Influence on Oral Cancer. *Front Cell Infect Microbiol*. 2020 Jan 15;9:476. doi: 10.3389/fcimb.2019.00476. PMID: 32010645; PMCID: PMC6974454.
11. Bartz H, Nonnenmacher Cb, Bollmann C, Kuhl M, Zimmermann S, Heeg K, et al. *Micromonas* (*Peptostreptococcus*) *micros*: unusual case of prosthetic joint infection associated with dental procedures. *Int J Med Microbiol*. 2005 Jan;294(7):465-70. doi: 10.1016/j.ijmm.2004.10.001. PMID: 15715175.
12. Ozok AR, Wu MK, Luppens SB, Wesselink PR. Comparison of growth and susceptibility to sodium hypochlorite of mono- and dual-species biofilms of *Fusobacterium nucleatum* and *Peptostreptococcus* (*Micromonas*) *micros*. *J Endod*.

2007 Jul;33(7):819-22. doi: 10.1016/j.joen.2007.03.008. Epub 2007 Apr 17. PMID: 17804319.

13. Duijvenbode DC, Kuiper JWP, Holewijn RM, Stadhouders A. Parvimonas micra Spondylodiscitis: A Case Report and Systematic Review of the Literature. *J Orthop Case Rep.* 2018;8(5):67-71. doi:10.13107/jocr.2250-0685.1216.

14. Durovic A, Eberhard N, Schären S, Widmer AF. Parvimonas micra as a rare cause of spondylodiscitis - case series from a single centre. *Swiss Med Wkly.* 2020 Jun 16;150:w20272. doi: 10.4414/smw.2020.20272. PMID: 32579699.

15. Prieto R, Callejas-Díaz A, Hassan R, de Vargas AP, López-Pájaro LF. Parvimonas micra: A potential causative pathogen to consider when diagnosing odontogenic brain abscesses. *Surg Neurol Int.* 2020 Jun 6;11:140. doi: 10.25259/SNI\_20\_2020. PMID: 32547827; PMCID: PMC7294173.

16. Yun SS, Cho HS, Heo M, Jeong JH, Lee HR, Ju S, et al. Lung abscess by Actinomyces odontolyticus and Parvimonas micra co-infection presenting as acute respiratory failure: A case report. *Medicine (Baltimore).* 2019;98(35):e16911. doi:10.1097/MD.00000000000016911.

17. Lindhe J. *Tratado de Periodontia Clínica e Implantologia Oral.* 5 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 2010.

18. Roberts MC. Antibiotic toxicity, interactions and resistance development. *Periodontol 2000.* 2002;28:280-97. doi: 10.1034/j.1600-0757.2002.280112.x. PMID: 12013346.

19. Pereira, MC; Defani, MA. *Plantas medicinais: modificando conceitos.* Universidade Estadual de Maringá 2007. 18 p.

20. Warriar PK, Nambiar VP, Ramnkutty CR. *Indian Medicinal Plants – A Compendium of 500 Species.* Chennai: Orient Longmann; 2002. pp. 8–12.

21. Thring TS, Hili P, Naughton DP. Anti-collagenase, anti-elastase and anti-oxidant activities of extracts from 21 plants. *BMC Complement Altern Med.* 2009 Aug 4;9:27. doi: 10.1186/1472-6882-9-27. PMID: 19653897; PMCID: PMC2728709.

22. Kumar R, Nair V, Singh S, Gupta YK. In vivo antiarthritic activity of Rosa centifolia L. flower extract. *Ayu.* 2015 Jul-Sep;36(3):341-5. doi: 10.4103/0974-8520.182753. PMID: 27313424; PMCID: PMC4895764.

23. Kumar R, Nair V, Gupta YK, Singh S. Anti-inflammatory and anti-arthritis activity of aqueous extract of Rosa centifolia in experimental rat models. *Int J Rheum Dis.* 2017 Sep;20(9):1072-1078. doi: 10.1111/1756-185X.12625. Epub 2015 Jul 27. PubMed PMID: 26222375.

24. Almasirad A, Amanzadeh Y, Taheri A, Iranshahi M. Composition of a historical rose oil sample (*Rosa damascena* Mill., Rosaceae). *J Essent Oil Res.* 2007;19(2):110–2. doi: 10.1080/10412905.2007.9699241

25. Eris R, Ulusoy S. Rose, Clove, Chamomile Essential Oils and Pine Turpentine Inhibit Quorum Sensing in *Chromobacterium violaceum* and *Pseudomonas aeruginosa*. *J Essent Oil Bear Plants*. 2013;16(2):126–35. doi: 10.1080/0972060X.2013.794026
26. Shokouhinejad N, Emaneini M, Aligholi M, Jabalameli F. Antimicrobial effect of *Rosa damascena* extract on selected endodontic pathogens. *J Calif Dent Assoc*. 2010 Feb;38(2):123-6. PMID: 20232691.
27. Maruyama N, Tansho-Nagakawa S, Miyazaki C, Shimomura K, Ono Y, Abe S. Inhibition of Neutrophil Adhesion and Antimicrobial Activity by Diluted Hydrosol Prepared from *Rosa damascena*. *Biol Pharm Bull*. 2017;40(2):161-168. doi: 10.1248/bpb.b16-00644. Erratum in: *Biol Pharm Bull*. 2017;40(4):546. PubMed PMID: 28154255.
28. Hajhashemi V, Ghannadi A, Hajiloo M. Analgesic and Anti-inflammatory Effects of *Rosa damascena* Hydroalcoholic Extract and its Essential Oil in Animal Models. *Iran J Pharm Res*. 2010 Spring;9(2):163-8. PMID: 24363723; PMCID: PMC3862064.
29. Lattanzio F, Greco E, Carretta D, Cervellati R, Govoni P, Speroni E. In vivo anti-inflammatory effect of *Rosa canina* L. extract. *J Ethnopharmacol*. 2011 Sep 1;137(1):880-5. doi: 10.1016/j.jep.2011.07.006. Epub 2011 Jul 13. PMID: 21771653.
30. Akram M, Riaz M, Munir N, et al. Chemical constituents, experimental and clinical pharmacology of *Rosa damascena*: a literature review. *J Pharm Pharmacol*. 2020;72(2):161-174. doi:10.1111/jphp.13185.
31. Palshetkar A, Pathare N, Jadhav N, Pawar M, Wadhwani A, Kulkarni S, et al. In vitro anti-HIV activity of some Indian medicinal plant extracts. *BMC Complement Med Ther*. 2020 Mar 6;20(1):69. doi: 10.1186/s12906-020-2816-x. PMID: 32143607; PMCID: PMC7076815.
32. Batool R, Kalsoom A, Akbar I, Arshad N, Jamil N. Antilisterial Effect of *Rosa damascena* and *Nymphaea alba* in *Mus musculus*. *Biomed Res Int*. 2018 Jan 23;2018:4543723. doi: 10.1155/2018/4543723. PMID: 29607320; PMCID: PMC5828332.
33. Mahabob N, Mohan J. Preparation of Mouthwash and Gel from *Rosa damascena* Mill and Evaluating Its Effectiveness-An In Vivo Analysis. *J Pharm Bioallied Sci*. 2019;11(Suppl 2):S198-S202. doi:10.4103/JPBS.JPBS\_294\_18.
34. Fatemi F, Golbodagh A, Hojihosseini R, Dadkhah A, Akbarzadeh K, Dini S, Malayeri MRM. Anti-inflammatory Effects of Deuterium-Depleted Water Plus *Rosa Damascena* Mill. Essential Oil Via Cyclooxygenase-2 Pathway in Rats. *Turk J Pharm Sci*. 2020 Feb;17(1):99-107. doi: 10.4274/tjps.galenos.2018.24381. Epub 2020 Feb 19. PMID: 32454767; PMCID: PMC7227869.
35. Galal TM, Al-Yasi HM, Fawzy MA, Abdelkader TG, Hamza RZ, Eid EM, et al. Evaluation of the Phytochemical and Pharmacological Potential of Taif's Rose (*Rosa damascena* Mill var. *trigintipetala*) for Possible Recycling of Pruning Wastes. *Life (Basel)*. 2022 Feb 12;12(2):273. doi: 10.3390/life12020273. PMID: 35207560;

PMCID: PMC8876584.

36. Sukumaran SK, Vadakkekuttical RJ, Kanakath H. Comparative evaluation of the effect of curcumin and chlorhexidine on human fibroblast viability and migration: An in vitro study. *J Indian Soc Periodontol.* 2020 Mar-Apr;24(2):109-116. doi: 10.4103/jisp.jisp\_173\_19. Epub 2020 Mar 2. PMID: 32189837; PMCID: PMC7069105.

## ANEXO A – Informativo técnico do extrato de *Rosa centifolia* L.



### EXTRATO GLICÓLICO DE ROSA BRANCA HG

**Nome Científico:** *Rosa centifolia* L / Rosaceae

**INCI:** Rosa Centifolia Flower Extract

**Nº CAS:** 84604-12-6

**Parte Utilizada:** Flores

**Fórmula Molecular:** N.A

**Peso Molecular:** N.A

#### PRINCÍPIOS ATIVOS

A Rosa é rica em óleo essencial, óleo fixo, aminoácidos, flavonóides, ácidos orgânicos (málico, tartárico), taninos, glicídios, pró-vitamina A, vitamina C, sais minerais.

#### PROPRIEDADES E INDICAÇÕES

Adstringente, cicatrizante, antiinflamatório, anti-séptico, calmante, refrescante (óleo essencial, taninos). Emoliente, hidratante, amaciante, restaurador (aminoácidos, óleo fixo, sais minerais), anti-radicais livres (vitaminas, flavonóides). Indicado para peles secas, sensíveis e acnêicas. Recomendado em loções tônicas, em formulações para massagem do corpo, e higiene pessoal.

Em cremes, géis e loções para o corpo - 3,0 a 8,0%. Em shampoos, condicionadores, sabonetes e tônicos - 1,0 a 5,0%. Em sabonetes em barra - 0,5 a 3,0%

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

#### ESTOCAGEM

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.

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