



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

NÁDIA DOMINGUES

**AVALIAÇÃO DE EXTRATOS DE PLANTAS MEDICINAIS EM
BIOFILMES MULTIESPÉCIE DE *Candida albicans* COM
Streptococcus mutans, *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus
faecalis* E *Pseudomonas aeruginosa***

2018

NÁDIA DOMINGUES

**AVALIAÇÃO DE EXTRATOS DE PLANTAS MEDICINAIS EM BIOFILMES
MULTIESPÉCIE DE *Candida albicans* COM *Streptococcus mutans*,
Staphylococcus aureus, *Enterococcus faecalis* E *Pseudomonas aeruginosa***

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 DOUTORA, pelo Programa de Pós-Graduação em BIOPATOLOGIA BUCAL, Área Microbiologia / Imunologia.

Orientadora: Profa. Adj. Luciane Dias de Oliveira

São José dos Campos

2018

Instituto de Ciência e Tecnologia [internet]. Normalização de tese e dissertação [acesso em 2018]. 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).

Domingues, Nádia

Avaliação de extratos de plantas medicinais em biofilmes multiespécie de *Candida albicans* com *Streptococcus mutans*, *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus faecalis* e *Pseudomonas aeruginosa* / Nádia Domingues. - São José dos Campos : [s.n.], 2018.

60 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, 2018.

Orientadora: Luciane Dias Oliveira.

1. Plantas medicinais. 2. Biofilme . 3. Bactérias . I. Oliveira, Luciane Dias , orient. II. Universidade Estadual Paulista (Unesp), Instituto de Ciência e Tecnologia, São José dos Campos. III. Universidade Estadual Paulista 'Júlio de Mesquita Filho' - Unesp. IV. Universidade Estadual Paulista (Unesp). V. Título.

BANCA EXAMINADORA

Profa. Adj. Luciane Dias de Oliveira (Orientadora)

Universidade Estadual Paulista (Unesp)

Instituto de Ciência e Tecnologia

Campus de São José dos Campos

Prof. Tit. Antonio Olavo Cardoso Jorge

Universidade Estadual Paulista (Unesp)

Instituto de Ciência e Tecnologia

Campus de São José dos Campos

Profa. Dra. Priscila Christiane Susy Liporoni

Universidade de Taubaté (Unitau)

Faculdade de Odontologia

Campus de Taubaté

Profa. Adj. Luana M. R. de Vasconcellos

Universidade Estadual Paulista (Unesp)

Instituto de Ciência e Tecnologia

Campus de São José dos Campos

Profa. Dra. Cristiane Aparecida Pereira

São José dos Campos, 07 de fevereiro de 2018.

DEDICATÓRIA

*A **DEUS**, PELO DOM DA VIDA, POR TODAS OPORTUNIDADES E POR ME DAR
FORÇAS PARA SEGUIR A CAMINHADA ÁRDUA DA VIDA COM SERENIDADE,
FAZENDO DOS OBSTÁCULOS APRENDIZAGEM E DAS OPORTUNIDADES
CONQUISTAS.*

*AOS MEUS QUERIDOS E AMADOS PAIS, **JARBAS** E **MARLENE**, PELO AMOR,
DEDICAÇÃO E POR ESTAREM PRESENTES EM TODOS OS MOMENTOS DE MINHA
VIDA. OBRIGADA POR ME AJUDAREM COM A MARIA FERNANDA, PELA EDUCAÇÃO
E VALORES QUE ME DÃO ATÉ HOJE.*

*À MINHA AMADA FILHA, **MARIA FERNANDA**, PELA PACIÊNCIA E PELA
COMPREENSÃO NOS MOMENTOS DE AUSÊNCIA, PELA AMIZADE E
COMPANHEIRISMO, TE AMO INFINITAMENTE.*

*AOS MEUS AMADOS IRMÃOS **JULIANO**, **CAMILA** E **MARCELO**, AMOR, CARINHO,
COMPREENSÃO, AMIZADE, POR PODER CONFIAR SEMPRE QUE PRECISAR E PELA
IMPORTÂNCIA EM MINHA VIDA.*

*AOS MEUS SOBRINHOS, POR FAZEREM A ALEGRIA DE MINHA VIDA COM OS
CUIDADOS E BAGUNÇAS.*

*A MEU AVÔ E PADRINHO **JOSÉ ANTÔNIO**, MINHAS TIAS **ÁGUEDA** E **MARIA
ANGÉLICA** E MEU TIO **ÂNGELO** (IN MEMORIAN) POR TODA AJUDA, AMOR E APOIO.*

AGRADECIMENTOS ESPECIAIS

À MINHA ORIENTADORA **PROFA. ADJ. LUCIANE DIAS DE OLIVEIRA** PELA ORIENTAÇÃO EM MEU DOUTORADO, PELA DEDICAÇÃO, CONFIANÇA E AMIZADE. A FORMA QUE CONDUZ O LEIC E A COORDENAÇÃO DA PÓS-GRADUAÇÃO, MOSTRA SEU PROFISSIONALISMO E COMPETÊNCIA, VOCÊ AGREGOU ENSINAMENTOS QUE LEVAREI SEMPRE COMIGO. MINHA GRATIDÃO, ADMIRAÇÃO E CARINHO.

AO **PROF. TIT. ANTONIO OLAVO CARDOSO JORGE** AGRADEÇO MEU ETERNO ORIENTADO, POR ME RECEBER NO LABORATÓRIO DE MICROBIOLOGIA, AJUDANDO E ACREDITANDO EM MEU DESENVOLVIMENTO E CRESCIMENTO PROFISSIONAL E PESSOAL. O SENHOR FOI FUNDAMENTAL PARA MEU APRENDIZADO. SUA DEDICAÇÃO, ENSINAMENTOS E SERÃO GUARDADOS SEMPRE. MINHA GRATIDÃO, ADMIRAÇÃO E RESPEITO.

À AMIGA **PROFA. DRA. CRISTIANE AP. PEREIRA CORREIA** AGRADEÇO POR ESTAR PRESENTE EM TODOS OS MOMENTOS, PELA AMIZADE CONSTRUÍDA, APRENDIZAGEM, ENSINAMENTOS, DEDICAÇÃO, PACIÊNCIA E PALAVRAS DE INCENTIVO. MINHA ETERNA GRATIDÃO, ADMIRAÇÃO E AMIZADE ETERNA.

À QUERIDA **PROFA. DRA. PRISCILA CHRISTIANE SUSY LIPORONE** MEU IMENSO AGRADECIMENTO POR ACREDITAR E APOIAR EM MINHAS ESCOLHAS PROFISSIONAIS, POR TODO ENSINAMENTO, CARINHO E DEDICAÇÃO. VOCÊ É RESPONSÁVEL POR EU ESTAR CONCLUINDO O DOUTORADO. MINHA ADMIRAÇÃO, RESPEITO E AMIZADE SEMPRE.

AO QUERIDO AMIGO **PROF. LUCAS DE PAULA RAMOS** PELA AJUDA E AMIZADE DESDE O MESTRADO, SEM VOCÊ ESSE TRABALHO NÃO SERIA POSSÍVEL. MINHA ADMIRAÇÃO E AMIZADE ETERNA.

AGRADECIMENTOS

À UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JÚLIO DE MESQUITA FILHO” INSTITUTO DE CIÊNCIA E TECNOLOGIA, CAMPUS DE SÃO JOSÉ DOS CAMPOS, NA PESSOA DO DIRETOR PROF. TIT. ESTEVÃO TOMOMITSU KIMPARA E DO VICE-DIRETORA PROFA.DRA. REBECA DI NICOLÓ.

AO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOPATOLOGIA BUCAL, COORDENADORA PROFA. ADJ. LUCIANE DIAS DE OLIVEIRA E VICE-COORDENADOR PROF DR. MAURO PEDRINE SANTAMARIA, PELO APOIO CONSTANTE PARA A REALIZAÇÃO DESSE TRABALHO.

À COORDENAÇÃO DE APERFEIÇOAMENTO DE PESSOAL DE NÍVEL SUPERIOR (CAPES) PELA CONCESSÃO DA BOLSA DE DOUTORADO.

AOS PROFESSORES DO CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOPATOLOGIA BUCAL, MUITO OBRIGADA PELOS ENSINAMENTOS E PELA CONTRIBUIÇÃO NA MINHA FORMAÇÃO PROFISSIONAL.

AOS FUNCIONÁRIOS DA SEÇÃO TÉCNICA DE PÓS-GRADUAÇÃO, PELA AJUDA DURANTE DA MINHA TRAJETÓRIA NESTA UNIVERSIDADE.

AOS TÉCNICOS DO LABORATÓRIO DE MICROBIOLOGIA, SÉRGIO E DOMINGOS, A SECRETÁRIA CARLA E A FAXINEIRA ANA PAULA AGRADEÇO POR TODA AJUDA, DEDICAÇÃO E MOMENTOS DE DESCONTRAÇÃO NO LABORATÓRIO ESSENCIAIS PARA O BOM ANDAMENTO DE MINHA PESQUISA.

À PROFA. ADJ. LUANA MAROTTA REIS DE VASCONCELLOS PELO CARINHO E DEDICAÇÃO. MINHA ADMIRAÇÃO E AMIZADE.

À PROFA. DRA. GRAZIELLA NUERNBERG BACK-BRITO PELO CARINHO E DEDICAÇÃO. POR ESTAR SEMPRE DISPONÍVEL ENSINANDO E ACONSELHANDO. MINHA ADMIRAÇÃO E AMIZADE.

*À PROFA. DRA. LILIANA SCORZONI, PELA SIMPLICIDADE E DISPONIBILIDADE.
MEU CARINHO E ADMIRAÇÃO.*

*ÀS MINHAS AMADAS AMIGAS ALESSANDRA PAES DE BARROS, ARIANE DE
CÁSSIA RIBEIRO DE CARVALHO E CAMILA MENDES MATHEUS, PELA AMIZADE,
CARINHO, AJUDA NOS MOMENTOS DIFÍCEIS, APOIO E CONFIANÇA. VOCÊS SÃO
FUNDAMENTAIS EM MINHA VIDA.*

*AOS QUERIDOS AMIGOS CONQUISTADOS, ADELINE LACERDA JORJÃO,
FERNANDA FREIRE, RAFAELLA BRAGA, DAMARA DA SILVA ÁVILA PELA AMIZADE
E COMPANHEIRISMO EM TODOS OS MOMENTOS.*

*AOS COLEGAS DE LABORATÓRIO PRESENTES QUE COMPARTILHAM DAS MESMAS
DIFICULDADES, ALEGRIAS E QUE DE CERTA FORMA CONTRIBUÍRAM PARA ESTE
TRABALHO. OBRIGADA POR ESTAREM EM MINHA VIDA.*

*ÀS ALUNAS DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA JÉSSICA, ANA E NATÁLIA QUE ME
AJUDARAM E DEIXARAM OS EXPERIMENTOS MAIS DIVERTIDOS.*

SUMÁRIO

RESUMO	08
ABSTRACT	09
1 INTRODUÇÃO	10
2 PROPOSIÇÃO.....	14
2.1 Objetivo geral.....	14
2.2 Objetivos específicos.....	14
3 MATERIAL E MÉTODOS.....	15
3.1 Extratos.....	15
3.2 Cepas.....	15
3.3 Formação do biofilme.....	16
3.3.1 Tratamentos aplicados nos biofilmes.....	18
3.3.2 Determinação de unidades formadoras de colônia (UFC/mL).....	19
3.4 Análise estatística	21
4 RESULTADOS.....	22
4.1 Biofilme multiespécie de <i>C. albicans</i> com <i>S. mutans</i>	22
4.2 Biofilme multiespécie de <i>C. albicans</i> com <i>S. aureus</i>	27
4.3 Biofilme multiespécie de <i>C. albicans</i> com <i>E. faecalis</i>	32
4.4 Biofilme multiespécie de <i>C. albicans</i> com <i>P. aeruginosa</i>	37
5 DISCUSSÃO.....	43
6 CONCLUSÃO.....	50
REFERÊNCIAS.....	51
ANEXOS.....	57

Domingues N. Avaliação de extratos de plantas medicinais em biofilmes multiespécie de *Candida albicans* com *Streptococcus mutans*, *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus faecalis* e *Pseudomonas aeruginosa* [tese]. São José dos Campos (SP): Universidade Estadual Paulista (Unesp), Instituto de Ciência e Tecnologia; 2018.

RESUMO

Os micro-organismos estão cada vez mais resistentes aos medicamentos disponíveis tanto na medicina quanto na odontologia, e esta resistência é ainda maior quando estão organizados em biofilmes mono ou multiespécies, de modo que o estudo de antimicrobianos alternativos, como fitoterápicos, estão em crescente ascensão. A interação entre leveduras e bactérias está intimamente presente na cavidade bucal, em que nichos como dentes, língua, mucosa e bolsa periodontal, nutrientes e temperatura adequados promovem condições favoráveis para formação do biofilme. Com isso, o objetivo deste trabalho foi avaliar a atividade antimicrobiana dos extratos de *Pfaffia paniculata* K (pfaffia), *Hamamelis virginiana* L. (hamamelis), *Stryphnodendron barbatiman* (barbatimão) e *Gymnema sylvestre* (gimena) em biofilmes heterotípicos de *Candida albicans* (ATCC 18804) com *Streptococcus mutans* (ATCC 35688), *Staphylococcus aureus* (ATCC 6538), *Enterococcus faecalis* (ATCC 4083) e *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 15442). Para isso, suspensões padronizadas em 10^7 cels/mL dos micro-organismos testes, foram distribuídos em placas de microtitulação de 96 poços, juntamente 100 µL de caldo BHI. As placas foram incubadas em estufa bacteriológica a 37°C/48h (5% de CO₂ para *S. mutans*) e, após, os biofilmes foram submetidos ao tratamento com os extratos por 5 min e 24 h, nas respectivas concentrações de 100 mg/mL, 50 mg/mL e 25 mg/mL. Foi utilizado solução salina 0,9% (5 min) ou caldo BHI (24 h) nos grupos controles. Após, os biofilmes foram lavados e desagregados do fundo da placa e diluições seriadas foram semeadas em ágar seletivo para cada micro-organismo. Foram realizadas contagens de UFC/mL (log₁₀) após 24 h de incubação e analisadas estatisticamente pelo método Kruskal-Wallis suplementado pelo teste de Dun's ($p < 0.05$). Os resultados obtidos indicaram reduções significativas promovidas pelos extratos nos dois tempos de tratamento analisados. Foi observado que o extrato de *H. virginiana* apresentou redução de todos os grupos analisados no tempo de tratamento de 24 h. Conclui-se que os extratos de *P. paniculata*, *H. virginiana*, *S. barbatiman* e *G. sylvestre* apresentaram ação antimicrobiana sobre biofilmes multiespécie de *C. albicans* com as bactérias de interesse médico-odontológico, nos tempos de tratamento de 5 min e 24 h.

Palavras-chave: Plantas medicinais. Biofilme. *Candida albicans*. *Streptococcus mutans*. *Staphylococcus aureus*. *Enterococcus faecalis*. *Pseudomonas aeruginosa*.

Domingues N. Evaluation of extracts of medicinal plants in biofilm multispecies of Candida albicans with Streptococcus mutans, Staphylococcus aureus, Enterococcus faecalis e Pseudomonas aeruginosa [doctorate thesis]. São José dos Campos (SP): São Paulo State University (Unesp), Institute of Science and Technology; 2018.

ABSTRACT

Microorganisms are increasingly resistant to drugs available in both medicine and dentistry, and this resistance is even greater when they are organized into mono or multispecies biofilms, so that the study of alternative antimicrobials, such as herbal medicines, are on the rise. The interaction between yeasts and bacteria is intimately present in the oral cavity, in which niches such as teeth, tongue, mucosa and periodontal pocket, food and adequate temperature promote adequate conditions for biofilm formation. The aim of this study was to evaluate the antimicrobial activity of extracts of Pfaffia paniculata K., Hamamelis virginiana L., Gymnema sylvestre and Stryphnodendron barbatiman M. in heterotopic biofilms of Candida albicans (ATCC 18804) with Streptococcus mutans (ATCC 35688), Staphylococcus aureus (ATCC 6538), Enterococcus faecalis (ATCC 4083), and Pseudomonas aeruginosa (ATCC 15442). Standardized suspensions at 10^7 cells/mL of the test microorganisms were distributed in 96 well microtiter plates together with 100 μ L of BHI broth, the plates were incubated in a bacteriological oven at 37°C/48h (5% CO₂ for S. mutans). After the incubation time, treatments were performed at 5 min and 24 h times, applying the respective extracts at the concentrations of 100 mg, 50 mg and 25 mg/mL and applying 0.9% saline solution or BHI broth in the control groups. After the biofilms were washed and disaggregated from the bottom of the plate, performing serial dilutions for later seeding in selective agar. UFC/ml ($\log_{10}$) counts were performed after 24 h of incubation and statistically analyzed Kruskal-Wallis method supplemented by the Dun's test ($p < 0.05\%$). The obtained results indicated significant reductions promoted by extracts in the two treatment times analyzed. It was observed that the extract of H. virginiana showed reduction of all the analyzed groups without treatment time of 24 h. It is concluded that the extracts of P. paniculata, H. virginiana, S. barbatiman and G. sylvestre presented antimicrobial action after analysis of the heterotypic biofilms of C. albicans with the bacteria of medical and dental interest, in the treatment times of 5 min and 24 h.

Keywords: Medicinal plants. Biofilm. Candida albicans. Streptococcus mutans. Staphylococcus aureus. Enterococcus faecalis. Pseudomonas aeruginosa.

1 INTRODUÇÃO

As leveduras e bactérias estão presentes de forma comensal na superfície da pele e mucosa do ser humano, e muitas vezes estão dispostas em nichos, como na cavidade bucal em que a língua, dentes, sulco gengival e mucosa podem favorecer seu crescimento, co-agregação e formação de biofilme. As bactérias se tornam mais resistentes quando dispostas em biofilme, uma estrutura tridimensional favorecida pela formação da matriz extracelular que confere proteção a esta estrutura; e pelo *quorum-sensing*, comunicação célula a célula, que atribui aos micro-organismos a capacidade de manutenção do biofilme, transferência de resistência a antibióticos, entre outras características (How et al., 2016; Hagen, Son, 2017; Hotterbeekx et al., 2017; Tomé et al., 2017). O estado de saúde é decorrente do equilíbrio da microbiota residente com as defesas do hospedeiro, mas o desequilíbrio desse sistema pode levar a um estado de doença, por infecções locais ou sistêmicas, causadas por micro-organismos (How et al., 2016).

Entre esses micro-organismos, *Streptococcus mutans* apresentam fatores de virulência, como: ser acidogênico, habilidade do *S. mutans* em fermentar carboidratos da dieta, principalmente a sacarose, e a partir dessa fermentação produzir ácidos que levam a desmineralização do esmalte dentário e promove um ambiente propício para o crescimento de espécies virulentas; ser acidúrico atribuindo a capacidade de sobreviver em meio ácido (Feldman et al., 2017), produção de polissacarídeos solúvel e insolúvel que promovem a adesão e substrato ao biofilme (Gulube, Patel, 2016; Hagen, Son, 2017). Além da cárie dentária, esse micro-organismo pode causar infecção no sistema de canais radiculares, abscesso odontogênico e endocardite bacteriana (Gulube, Patel, 2016) e estudos relatam sua resistência a antibióticos (Mikami et al., 2011; Loyola-Rodriguez et al., 2014). O habitat formado pelo *S. mutans* estimula o crescimento e a virulência de outros micro-organismos, como *C. albicans* (Gulube, Patel, 2016), um fungo comensal (de Oliveira et al., 2013; O'Meara et al., 2017), porém oportunista, principalmente em pacientes imunocomprometidos, causando candidose bucal, onde coloniza a mucosa, língua e palato; candidose vaginal ou sistêmica. *C. albicans* é um fungo dimórfico, ou seja, pode se apresentar na forma de levedura ou hifa de acordo com

as condições nutricionais e ambientais em que se encontra (Kong et al., 2017) O biofilme é um importante fator de virulência para essa espécie, aumentando sua resistência a terapia antifúngica (de Oliveira et al., 2013).

Staphylococcus aureus é outro micro-organismo de interesse, pois desempenha um papel importante na microbiota e causa infecções nosocomiais como: infecções de pele, em tecidos moles, pneumonia, septicemia, peritonite, bacteremia e endocardite (Kipre et al., 2017; Parker, 2017). *Pseudomonas aeruginosa* causa doenças gastrointestinais, urogenital e contaminação de feridas, como *S. aureus*, e ambos são resistentes a uma gama de agentes antimicrobianos (Elisha et al., 2017). *S. aureus* é encontrado principalmente na superfície de feridas, enquanto *P. aeruginosa* está presente nas camadas mais profundas (Hotterbeekx et al., 2017), e pacientes em unidade de cuidados intensivos, doenças crônicas e pacientes queimados estão mais susceptíveis a infecções por esta espécie (Gholami et al., 2017).

Com grande adaptação a condições ambientais adversas e potencial em desenvolver resistência a antibioticoterapia, *Enterococcus faecalis*, uma bactéria aerotolerante, presente no trato gastrointestinal de humanos, animais e insetos, é responsável por infecções no trato urinário, infecções de próteses oculares, bacteriemia, infecções abdominais pélvicas, endocardite (Ali et al., 2017; Biaggini et al., 2017; Cheng et al., 2017). *E. faecalis* tem como característica a adaptação a condições ambientais adversas (Ali et al., 2017) e mostra-se resistente a uma gama de antibióticos (Ali et al., 2017; Biaggini et al., 2017; Cheng et al., 2017). Está presente em infecções endodônticas primárias e está intimamente relacionado a falha no tratamento endodôntico (Yadav et al., 2017).

Esses e outros micro-organismos tem desenvolvido mecanismos de adaptação à antimicrobianos utilizados atualmente, sendo essa resistência um problema crescente (Liakos et al., 2017). O maior desafio da saúde mundial é a necessidade do desenvolvimento de novos antimicrobianos eficazes para combater os micro-organismos cada vez mais resistentes. Desta forma, as plantas medicinais têm sido muito estudadas, por produzir uma variedade de metabólitos secundários, como alcaloides, glicosídeos, terpenóides, saponinas, esteroides, flavonoides, taninos, quinonas e cumarinas (Elisha et al., 2017).

Dentre as diversas plantas, destaca-se *Pfaffia paniculata*, pertencente à família *Amaranthaceae* (da Silva et al., 2010; de Paula-Ramos et al., 2016), conhecido popularmente como “ginseng brasileiro” ou “paratudo”, nativa do Brasil, e que tem sido popularmente usada como tônico, afrodisíaco e para o tratamento de diabetes, úlceras, câncer e como analgésico. Além disso, tem sido atribuída propriedades antineoplásicas, além de efeitos anti-inflamatório e analgésico (Li et al., 2010; Nagamine et al., 2009; Pinello et al., 2006). Costa CA et al. (2015) avaliaram a atividade anti-inflamatória intestinal do extrato bruto de *P. paniculata* em ratos, antes e depois da indução de colite ulcerativa usando ácido trinitrobenzenesulfônico e concluíram que o extrato bruto de *P. paniculata* não foi capaz de prevenir a inflamação intestinal induzida pelo ácido trinitrobenzenesulfônico, mas foi capaz de reduzir a inflamação crônica, sugerindo um potencial curativo deste extrato. A ação de *P. paniculata* K, juntamente com outros extratos contra biofilme de *Klebsiella pneumoniae* (ATCC 4352) foi analisada por de Paula-Ramos et al. (2016), que verificaram que os extratos de *P. paniculata* K. e *Rosmarinus officinalis* L. foram efetivos contra o biofilme de *K. pneumoniae*.

Hamamelis virginiana L. da família *Hamamelidaceae*, originária do leste da América do Norte, apresenta uma longa história na terapia farmacêutica. Taninos e flavonóides são os principais componentes ativos encontrados em *H. virginiana* (Mouchrek Junior et al., 2015), e apresenta propriedades antiviral, anti-inflamatória e adstringente, muito usada para cuidados com a pele, dermatite atópica, tratamento de feridas, inflamações locais e diarreia (Duckstein et al., 2012; Theisen et al., 2014), além de propriedades antimutagênica e antioxidante (Theisen et al., 2014).

Gymnema sylvestre R., pertencente à família *Asclepiadaceae*, planta trepadeira distribuída em grande parte do sudoeste da China e na Índia, usada na medicina Ayurvédica. Conhecida também como “Gurmar” que significa “destruidor de açúcar” (Capolupo et al., 2017; Ota and Ulrih, 2017; Zuñiga et al., 2017), suas folhas apresentam propriedades de inibir o sabor doce, e é usada comumente no tratamento de diabete *melitus*, obesidade, asma, mordida de cobra e também tem demonstrado efeitos antiviral e antialérgico. Apresenta componentes ativos, denominados ácidos gimnênicos e componentes bioativos, as saponinas triterpênicas (Capolupo et al., 2017; Chen, Guo, 2017).

Espécie originária do cerrado, na região central do Brasil, a espécie *Stryphnodendron barbatiman* (Mart.), conhecida como “barbatimão” (Reicher et al., 1991), possui características semelhantes a outras espécies de *Stryphnodendron*, como *Stryphnodendron adstringens*, é popularmente usada como antisséptico, antimicrobiano, no tratamento de leucorréia, gonorreia, gastrite, diarreia, cicatrização de ferida (Costa MA et al., 2013; Ishida et al., 2009; Lopes et al., 2005). A casca do caule de barbatimão é rica em tanino (10-37%), flavan-3-óis, proantocianidinas, prodelfinidinas e prorobinetinidinas, sendo taninos responsáveis por promover a cicatrização de feridas por vários mecanismos celulares (Ishida et al., 2009; Lopes et al., 2005). Trolezi et al. (2017) investigaram a atividade antifúngica e toxicidade do extrato bruto da casca de *S. adstringens* e taninos disponível comercialmente em *Pythium insidiosum*, *in vitro* e *in vivo*, e não foi observada toxicidade em ratos e coelhos inoculados com os produtos, enquanto *in vitro*, apresentaram efeito antifúngico direto.

No entanto, há ainda a necessidade de mais estudos para avaliar a ação dos extratos de plantas em micro-organismos de interesse médico-odontológico, uma vez que ainda é escasso o uso de fitoterápicos na Odontologia, considerando principalmente a crescente resistência de bactérias e fungos aos antimicrobianos convencionais.

2 PROPOSIÇÃO

2.1 Objetivo geral

O objetivo do presente estudo foi avaliar a ação de 4 extratos de plantas medicinais sobre biofilmes multiespécie de micro-organismos de interesse médico-odontológico, em 2 diferentes períodos de tempo.

2.2 Objetivos específicos

Os objetivos específicos foram:

- a) avaliar a atividade antimicrobiana de três diferentes concentrações dos extratos naturais de *Pfaffia paniculata* (pfaffia), *Hamamelis virginiana* (hamamélis), *Gymnema sylvestre* (gimena) e *Stryphnodendron barbatiman* (barbatimão) sobre biofilme multiespécie de *Candida albicans* com *Streptococcus mutans*, *C. albicans* com *Staphylococcus aureus*, *C. albicans* com *Enterococcus faecalis* e *C. albicans* com *Pseudomonas aeruginosa*, no tempo de contato de 5 min;
- b) avaliar a atividade antimicrobiana de três diferentes concentrações dos extratos naturais de *P. paniculata* (pfaffia), *H. virginiana* (hamamélis), *G. sylvestre* (gimena) e *S. barbatiman* (barbatimão) sobre biofilmes multiespécie citados acima, no tempo de contato de 24 h.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Extratos

Foram adquiridos os extratos de *Pfaffia paniculata* Kuntze, *Hamamelis virginiana* Leaf e *Stryphnodendron barbatiman* Mart. extraído das plantas (Mapric, São Paulo, Brasil) e de *Gymnema sylvestre* (All Chemistry, São Paulo, Brasil) com os devidos laudos e especificações (ANEXO A a D).

Os extratos foram formulados a partir a partir da raiz da planta *P. paniculata* (pfaffia), o extrato de *H. virginiana* (hamamelis) a partir das folhas, o extrato de *S. barbatiman* (barbatimão) da casca da árvore e o extrato de *G sylvestre* (gimena) foi extraído do caule e das folhas da planta. Os 4 extratos são de origem nacional e foram adquiridos comercialmente na concentração de 200 mg/mL em propilenoglicol.

3.2 Cepas

As cepas utilizadas neste estudo são cepas de referência (ATCC - American Type Culture Collection) de *C. albicans* (ATCC 18804), *S. mutans* (ATCC 35688), *S. aureus* (ATCC 6538), *E. faecalis* (ATCC 4083), e *P. aeruginosa* (ATCC 15442), provenientes do Laboratório de Microbiologia e Imunologia Bucal do Curso de Odontologia do ICT – UNESP. Armazenadas em freezer a -80°C, as cepas foram reativas em caldo Infusão cérebro coração (BHI - Brain hearth infusion, Kasvi) e incubado em estufa a 37°C, por 24 h. As suspensões foram semeada em ágar seletivo para o micro-organismo para verificação das mesmas, sendo Ágar Sabouraud Dextrose (Kasvi, Itália) acrescido com 50 mg/L de clorafenicol (União Química, São Paulo, Brasil) para *C. albicans*, Ágar Mitis Salivarius Bacitracina Sacarose, acrescido de 2 unidades internacionais - UI/mL de Bacitracina e 150g/L sacarose (Difco, Detroit, USA) para *S. mutans*; e Ágar BHI acrescido NaCl (Ágar BHI (Kasvi, Itália) acrescido 0,75% de NaCl) para *S. aureus*, *Enterococcus* Ágar (Difco,

Detroit, USA) para *E. faecalis* e para *P. aeruginosa* foi utilizado Ágar MacConkey (Acumedia - Neogen, Michigan, USA).

3.3 Formação do biofilme

Após o processo de reativação dos micro-organismos foi iniciado o processo de formação do biofilme, para isto, colônias dos micro-organismos foram diluídas em solução salina estéril 0,9%, formando suspensões microbianas. As suspensões foram padronizadas em espectrofotômetro (AJX-1900, Micronal, São Paulo, Brasil) em 10^7 UFC/mL, os parâmetros de densidade óptica e comprimento de ondas utilizado foram descritos no Quadro 1.

Quadro 1 – Comprimentos de onda (λ) e densidades ópticas (DO) utilizados no espectrofotômetro para padronização dos micro-organismos

Micro-organismos	λ (nm)	DO
<i>C. albicans</i>	530	0,381
<i>S. mutans</i>	398	0,560
<i>S. aureus</i>	490	0,447
<i>E. faecalis</i>	760	0,385
<i>P. aeruginosa</i>	630	0,08*

Legenda: * 10^8 UFC/mL, houve diluição de 1/10 para resultar em 10^7 UFC/mL.

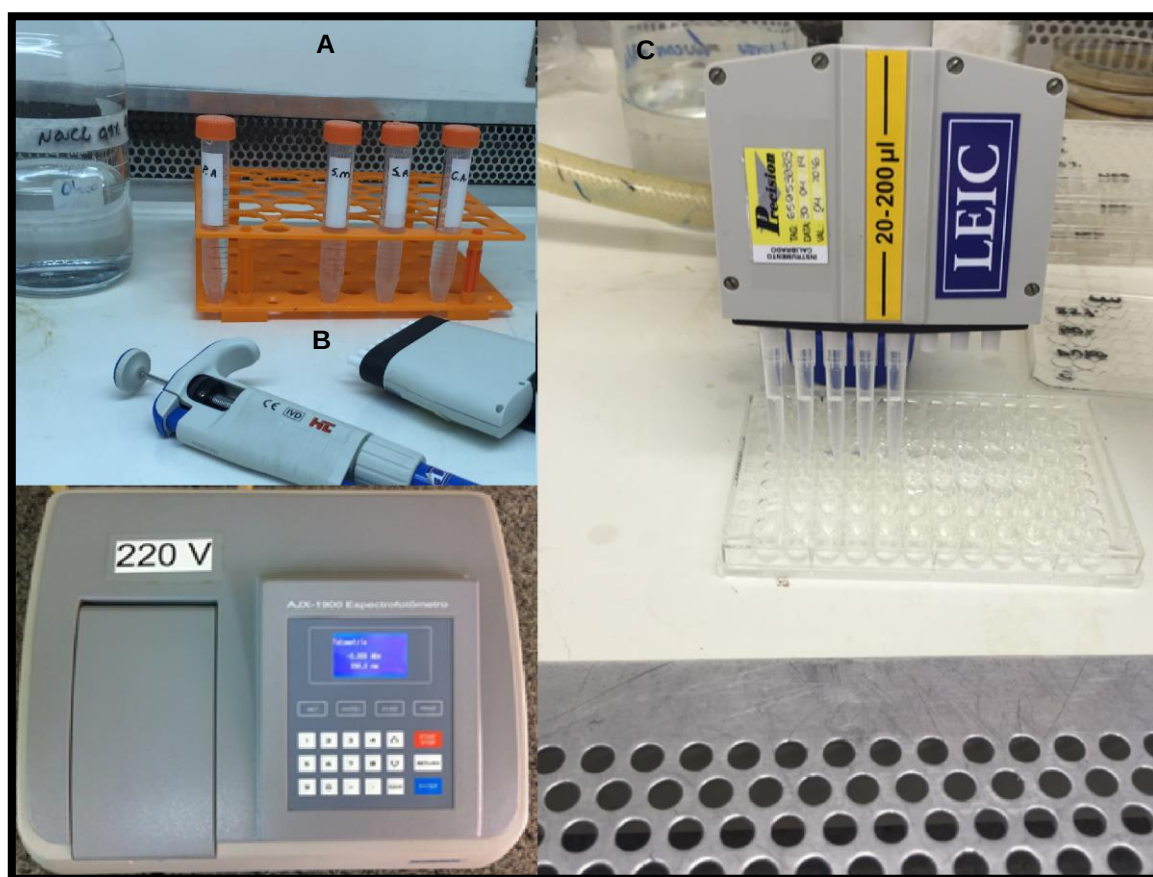
Fonte: Elaborado pelo autor.

As suspensões padronizadas foram distribuídas em placas de microtitulação de 96 poços (TPP, Zollstrasse, Suíça) conforme figura 1, respeitando os grupos experimentais expressos no quadro 1. Para cada grupo de interação dos micro-organismos (Quadro 2) foi realizado um grupo controle de crescimento dos micro-organismos isolados em que foi acrescido 100 μ L da suspensão do micro-organismo e 100 μ L de caldo BHI e para o grupo controle da interação e para o grupo tratado

de crescimento das interações foi acrescido 50 μ L da suspensão de *C. albicans* e 50 μ L da suspensão do micro-organismos de acordo com o grupo experimental mais 100 μ L de caldo BHI.

Em seguida, as placas de 96 poços foram incubadas em estufa bacteriológica a 37°C (a 5% de CO₂ para *S. mutans*) por 48 h, com troca de meio em 24 h.

Figura 1 - Preparo e distribuição da suspensão de micro-organismo na microplaca de 96 poços



Legenda: a) Preparo das suspensões de micro-organismos; b) Padronização em espectrofotômetro; c) Distribuição das suspensões padronizadas em placa de 96 poços.
Fonte: Elaborado pelo autor.

Quadro 2 - Distribuição dos grupos experimentais

Grupos experimentais	Volume da suspensão	Volume do caldo	N
<i>C. albicans</i> + <i>S. mutans</i>	50 µL + 50 µL	100 µL	n=10
<i>C. albicans</i> + <i>S. aureus</i>	50 µL + 50 µL	100 µL	n=10
<i>C. albicans</i> + <i>E. faecalis</i>	50 µL + 50 µL	100 µL	n=10
<i>C. albicans</i> + <i>P. aeruginosa</i>	50 µL + 50 µL	100 µL	n=10

Fonte: Elaborado pelo autor.

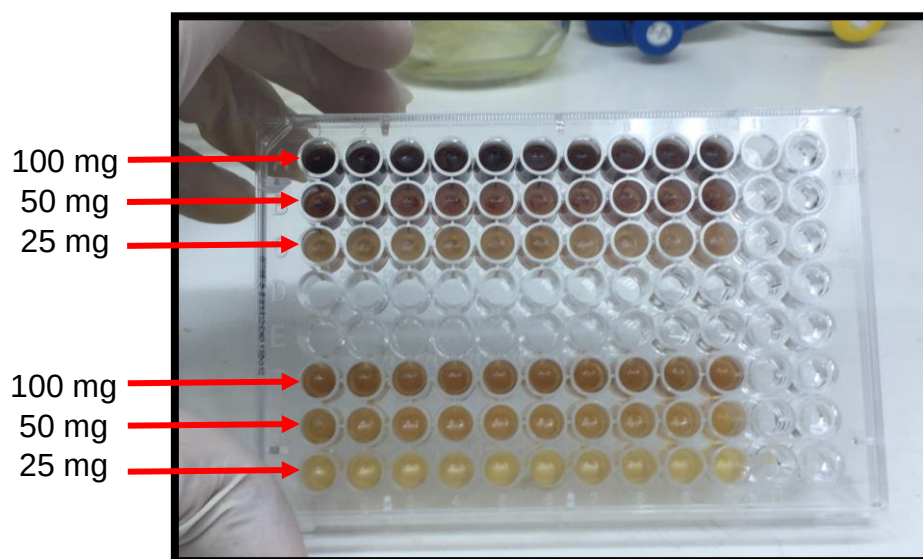
3.3.1 Tratamentos aplicados nos biofilmes

Após o processo de formação do biofilme por 48 h foram realizados os tratamentos nos respectivos grupos.

Para o tratamento dos biofilmes no tempo de 5 min foram acrescentados 200 µL de solução salina estéril 0,9% nos poços do biofilme dos grupos controles, considerando os grupos da levedura e das bactérias isoladas, além do grupo controle com as interações microbianas. Os tratamentos com os extratos naturais foram realizados apenas nos biofilmes das interações com a aplicação de 200 µL dos respectivos extratos, *P. paniculata* (pfaffia), *H. virginiana* (hamamélis), *G. sylvestre* (gimena) e *S. barbatiman* (barbatimão), de acordo com a concentração de 100 mg/mL, 50 mg/mL e 25 mg/mL. Os extratos foram diluídos em solução salina estéril a 0,9% para obtenção das concentrações desejadas, respectivamente em 50%, 25% e 12,5%.

O tratamento do biofilme no tempo de 24 h foi realizado acrescentando 200 µL de caldo BHI nos grupos controles (bactéria isolada, levedura isolada e interação de ambas). Já para os grupos experimentais foram acrescentados 200 µL dos extratos de acordo com os grupos, 100 mg/mL, 50 mg/mL e 25 mg/mL. Os extratos foram diluídos em caldo BHI para obtenção das concentrações desejadas, 50%, 25% e 12,5% respectivamente.

Figura 2- Aplicação dos extratos naturais nas diferentes concentrações



Legenda: Placa de 96 poços contendo grupos tratados com extratos.
Fonte: Elaborado pelo autor.

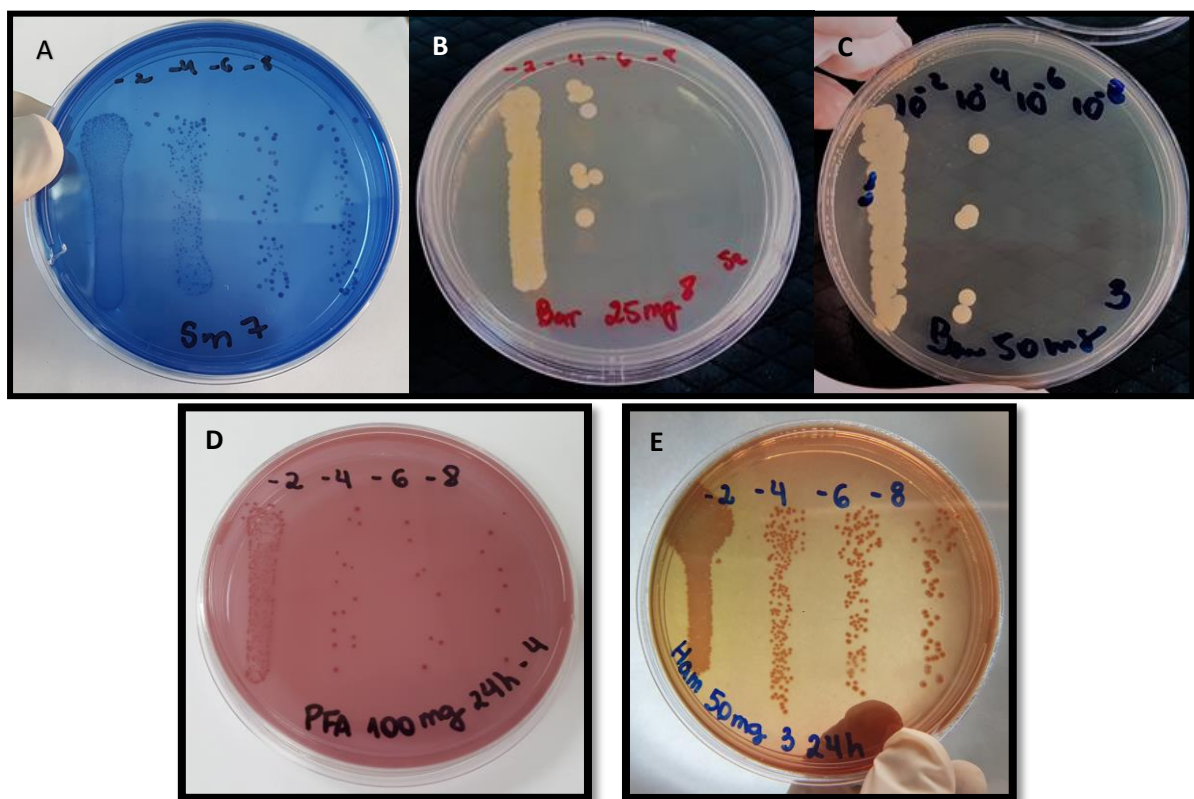
3.3.2 Determinação de unidades formadoras de colônia (UFC/mL)

Após o período de exposição aos extratos (no tempo de 5 min e 24 h), os poços contendo biofilme foram lavados três vezes com solução salina estéril 0,9%, para remoção total do extrato e das células dos micro-organismos que foram afetadas pelos tratamentos.

Em seguida, o biofilme de cada poço foi desagregado com auxílio do homogeneizador ultrassônico (VCX 130 - Sonics Vibra Cell, Connecticut, EUA) utilizando ponteira multicanal. A partir da solução obtida foram realizadas diluições seriadas das suspensões dos biofilmes, as quais foram semeadas em placas contendo meios de cultura seletivos (Figura 3), específicos para cada micro-organismo: Ágar Sabouraud Dextrose (Kasvi, Itália) acrescido com 50 mg/L de clorafenicol (União Química, São Paulo, Brasil) para *C. albicans*, Ágar Mitis Salivarius Bacitracina Sacarose, acrescido de 2 UI/mL de Bacitracina e 150 g/L sacarose (Difco, Detroit, USA) para *S. mutans*; e Ágar BHI acrescido NaCl (Ágar BHI (Kasvi, Itália) acrescido 0,75% de NaCl) para *S. aureus*, *Enterococcus* Ágar (Difco,

Detroit, USA) para *E. faecalis* e Ágar MacConkey (Acumedia - Neogen, Michigan, USA) para *P. aeruginosa*. As placas foram incubadas a 37°C (5% de CO₂ para *S. mutans*) por 24 h. Após incubação, as colônias foram contadas para o cálculo de unidades formadoras de colônias por mililitro (UFC/mL).

Figura 3 - Crescimento de colônias após semeadura em ágar seletivo para cada micro-organismo



Legenda: Crescimento dos micro-organismos em ágar específico. A) *S. mutans* (MSBS - Mitis Salivarius Bacitracina Sacarose); B) *S. aureus* (ágar BHI acrescido 7,5% de NaCl); C) *C. albicans* (ágar Sabouraud com Clorafenicol); D) *E. faecalis* (Enterococos ágar); E) *P. aeruginosa* (ágar MacConkey).

Fonte: Elaborado pelo autor.

3.4 Análise estatística

Os dados obtidos foram submetidos ao teste de normalidade, onde nenhum dos grupos obteve distribuição normal, portanto foram analisados estatisticamente pelo método Kruskal-Wallis suplementado pelo teste de Dun's com nível de significância de 5% ($p \leq 0,05$), por meio do software *Graph Pad Prism* 5.0 (GraphPad Software, Inc., CA, USA).

4 RESULTADOS

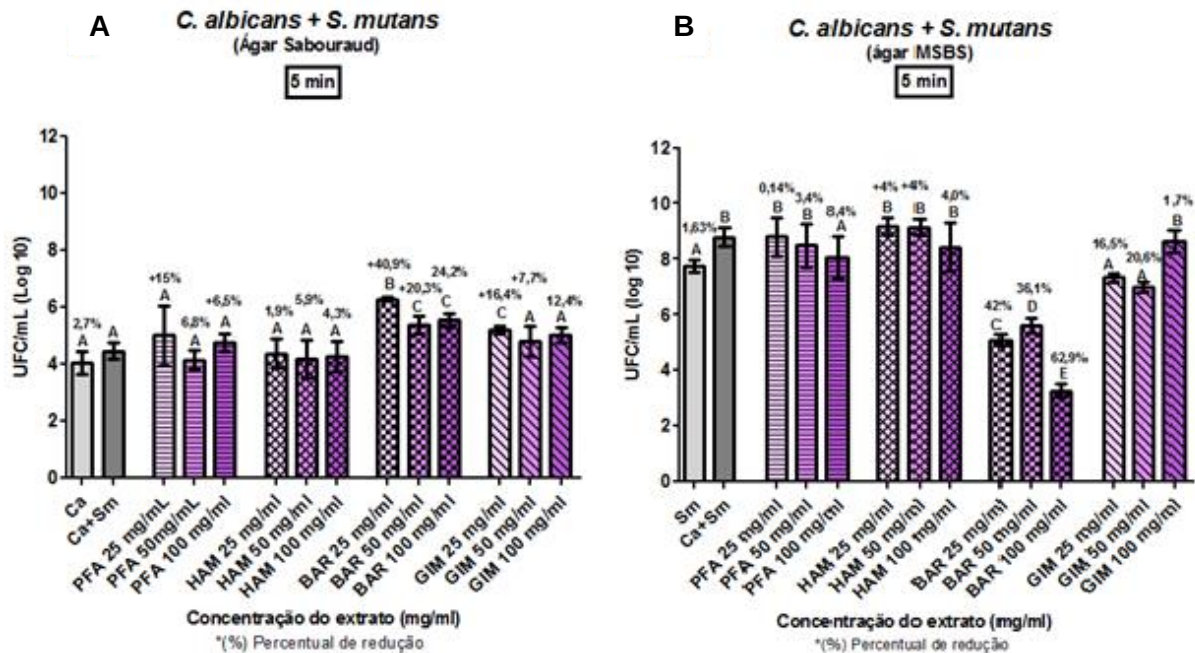
4.1 Biofilme multiespécie de *C. albicans* com *S. mutans*

Avaliando a formação de biofilme do grupo controle de *C. albicans* (Ca) e *C. albicans* em associação com *S. mutans* (Ca+Sm), na figura 4A, observa-se que foram estatisticamente iguais. Em relação aos efeitos dos tratamentos com os extratos, verificou-se, no tempo de contato de 5 min, que *P. paniculata* (pfaffia), *H. virginiana* (hamamelis) nas concentrações de 100, 50 e 25 mg/mL e de *G. sylvestre* (gimena) a 100 e 50 mg/mL, apresentaram resultados semelhantes ao controle (Ca+Sm). Já o extrato de *S. barbatiman* (barbatimão) nas concentrações de 100, 50 e 25 mg/mL, e *G. sylvestre* (gimena) em 25 mg/mL promoveram aumento significativo na formação do biofilme *C. albicans* quando comparados ao controle (Ca+Sm).

Analisando *S. mutans*, o grupo controle da interação de *C. albicans* com *S. mutans* (Ca+Sm), promoveu aumento no crescimento de *S. mutans* comparado com o controle de *S. mutans* (Sm) isolado (Figura 4B).

No tempo de tratamento de 5 min (Figura 4B), verificou-se que o extrato de *S. barbatiman* (barbatimão) promoveu reduções significativas do biofilme de *S. mutans* em comparação aos demais grupos ($p < 0,05$). Os extratos de *G. sylvestre* (gimena) 50 e 25 mg/mL e *P. paniculata* (pfaffia) 100 mg/mL promoveram redução significativa ($p < 0,05$) do biofilme de *S. mutans* em comparação ao grupo controle da interação (Ca+Sm). Os demais extratos não promoveram reduções na contagem de UFC/mL.

Figura 4 - Aplicação dos tratamentos por 5 min sobre biofilmes multiespécie de *C. albicans* e *S. mutans*



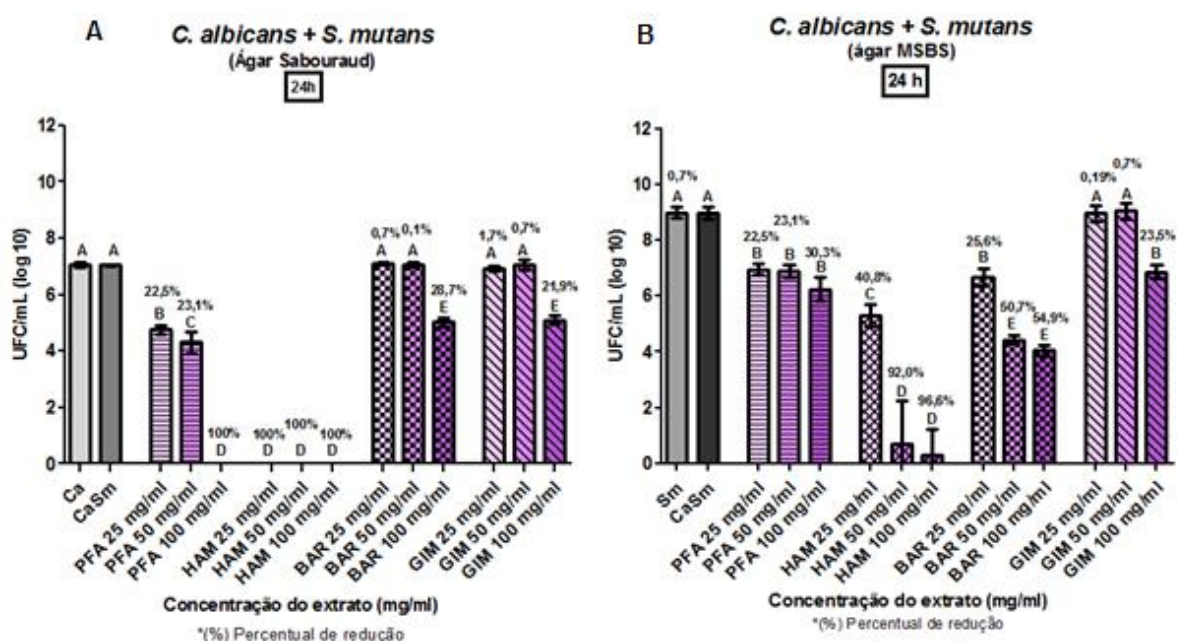
Legenda: A) Gráfico indicando os resultados obtidos após aplicação dos extratos por 5 min na interação de *C. albicans* e *S. mutans* em ágar Sabouraud com Clorafenicol; B) Gráfico indicando os resultados obtidos após aplicação dos extratos por 5 min na interação de *C. albicans* e *S. mutans* em ágar MSBS; Ca - Grupo controle de *C. albicans*; Sm - Grupo controle de *S. mutans*; Ca+Sm - Grupo interação de *C. albicans* com *S. mutans*; PFA - Extrato de *P. paniculata* (pfaffia) nas concentrações de 100, 50 e 25 mg/mL; HAM - Extrato de *H. virginiana* (hamamelis) nas concentrações de 100, 50 e 25 mg/mL; BAR - Extrato de *S. barbatiman* (barbatimão) nas concentrações de 100, 50 e 25 mg/mL; GIM - Extrato de *G. sylvestre* (gimena) nas concentrações de 100, 50 e 25 mg/mL; Letras indicam as diferenças estatisticamente significante (teste de *Kruskal-Wallis* suplementado pelo teste de *Dun's*, $p < 0,05$).

Fonte: Elaborado pelo autor.

No tempo de avaliação de 24 h, os grupos controles (Ca e Ca+Sm e Sm e Ca+Sm) não apresentaram diferença estatística (Figura 5A e 5B). Na figura A, pode-se verificar que para *C. albicans*, os extratos de *P. paniculata* (pfaffia) em 100 mg/mL e *H. virginiana* (hamamelis) em todas as concentrações aplicadas (100, 50 e 25 mg/mL) promoveram redução de 100%. Os extratos de *P. paniculata* (pfaffia) em 50 e 25 mg/mL, *G. sylvestre* (gimena) e *S. barbatiman* (barbatimão) na concentração de 100 mg/mL também promoveram reduções significativas de *C. albicans* ($p < 0,05$). As demais concentrações dos extratos apresentam resultados semelhantes ao grupo controle. Estes resultados podem ser observados na figura 5A.

Para *S. mutans*, com exceção do extrato de *G. sylvestre* (gimena) 50 e 25 mg/mL, todos os extratos apresentaram reduções significativas de UFC/mL ($p < 0,05$), sendo os extratos de *H. virginiana* (hamamelis) e *S. barbatiman* (barbatimão) em 100 e 50 mg/mL, os que apresentaram as maiores reduções ($p < 0,05$) (Figura 5B).

Figura 5 - Aplicação dos tratamentos por 24h sobre biofilmes multiespécie de *C. albicans* e *S. mutans*



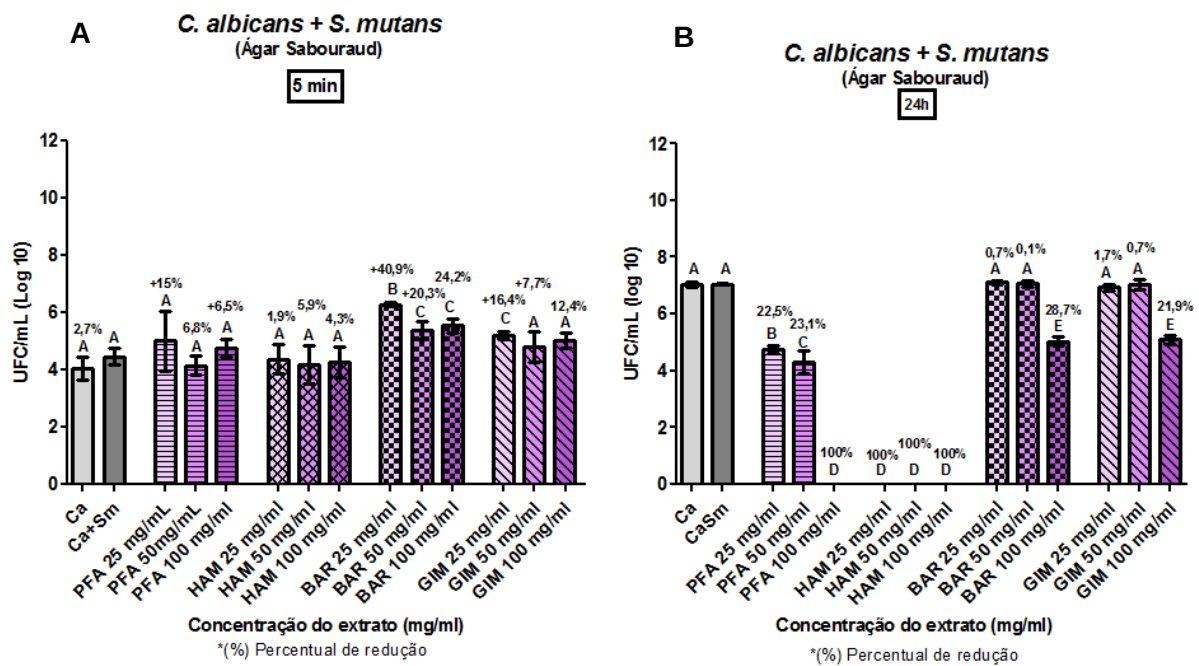
Legenda: A) Gráfico indicando os resultados obtidos após aplicação dos extratos por 24 h na interação de *C. albicans* e *S. mutans* em ágar Sabouraud com Clorafenicol; B) Gráfico indicando os resultados obtidos após aplicação dos extratos por 24 h na interação de *C. albicans* e *S. mutans* em ágar MSBS; Ca - Grupo controle de *C. albicans*; Sm - Grupo controle de *S. mutans*; Ca+Sm - Grupo interação de *C. albicans* com *S. mutans*; PFA - Extrato de *P. paniculata* (pfaffia) nas concentrações de 100, 50 e 25 mg/mL; HAM - Extrato de *H. virginiana* (hamamelis) nas concentrações de 100, 50 e 25 mg/mL; BAR - Extrato de *S. barbatiman* (barbatimão) nas concentrações de 100, 50 e 25 mg/mL; GIM - Extrato de *G. sylvestre* (gimena) nas concentrações de 100, 50 e 25 mg/mL; Letras indicam as diferenças estatisticamente significante (teste de Kruskal-Wallis suplementado pelo teste de Dun's, $p < 0,05$).

Fonte: Elaborado pelo autor.

Ao comparar o biofilme de *C. albicans* nos tempos de 5 min e 24 h, observa-se que no tempo de 5 min de tratamento (Figura 6A) os quatro extratos analisados

apresentaram resultados semelhantes ao grupo controle. O extrato de *S. barbatiman* (barbatimão) nas concentrações de 100, 50 e 25 mg/mL e de *G. sylvestre* (gimena) em 25 mg/mL favoreceram o crescimento do biofilme de *C. albicans*. No entanto, quando observamos o tratamento do biofilme no tempo de 24 h (Figura 6B), observa-se que as três concentrações (100, 50 e 25 mg/mL) do extrato de *H. virginiana* (hamamelis) e *P. paniculata* (pfaffia) em 100 mg/mL obtiveram uma redução de 100% do biofilme. O extrato de *P. paniculata* (pfaffia) nas concentrações de 50 e 25 mg/mL e os extratos de *S. barbatiman* (barbatimão) e *G. sylvestre* (gimena) nas concentrações de 100 mg/mL apresentaram redução do crescimento de *C. albicans* estatisticamente significativa ($p < 0,05$).

Figura 6 - Aplicação dos tratamentos por 5 min e 24 h sobre biofilmes de *C. albicans*

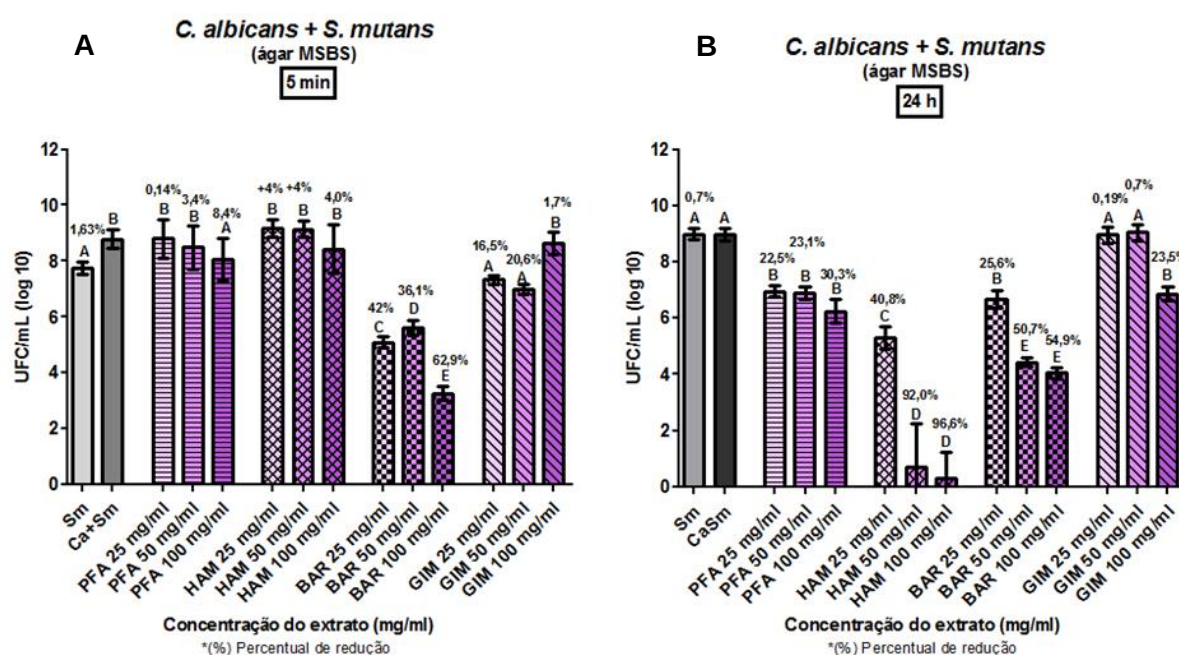


Legenda: A) Gráfico indicando os resultados obtidos após aplicação dos extratos por 5 min na interação de *C. albicans* e *S. mutans* analisando o biofilme de *C. albicans*; B) Gráfico indicando os resultados obtidos após aplicação dos extratos por 24 h na interação de *C. albicans* e *S. mutans* analisando o biofilme de *C. albicans*; Ca - Grupo controle de *C. albicans*; Ca+Sm - Grupo interação de *C. albicans* com *S. mutans*; PFA - Extrato de *P. paniculata* (pfaffia) nas concentrações de 100, 50 e 25 mg/mL; HAM - Extrato de *H. virginiana* (hamamelis) nas concentrações de 100, 50 e 25 mg/mL; BAR - Extrato de *S. barbatiman* (barbatimão) nas concentrações de 100, 50 e 25 mg/mL; GIM - Extrato de *G. sylvestre* (gimena) nas concentrações de 100, 50 e 25 mg/mL; Letras indicam as diferenças estatisticamente significante (teste de *Kruskal-Wallis* suplementado pelo teste de *Dun's*, $p < 0,05$).

Fonte: Elaborado pelo autor.

No biofilme de *S. mutans* no tempo de 5 min (Figura 7A), o extrato de *S. barbatiman* (barbatimão) nas concentrações de 100, 50 e 25 mg/mL, *G. sylvestre* (gimena) a 50 e 25 mg/mL e *P. paniculata* (pfaffia) a 100 mg/mL, apresentaram redução estatisticamente significativa ($p < 0,05$) quando comparamos com o grupo controle *C. albicans* com *S. mutans* (Ca+Sm). No tempo de 24 h (Figura 7B), o extrato de *G. sylvestre* (gimena) a 100 mg/mL e os outros extratos nas três concentrações analisadas, obtiveram diferença estatística significativa ($p < 0,05$), sendo que *H. virginiana* (hamamelis) nas concentrações de 100 e 50 mg/mL, apresentaram as maiores reduções no crescimento de *S. mutans*.

Figura 7 - Aplicação dos tratamentos por 5 min e 24 h sobre biofilmes de *S. mutans*



Legenda: A) Gráfico indicando os resultados obtidos após aplicação dos extratos por 5 min na interação de *C. albicans* e *S. mutans* analisando o biofilme de *S. mutans*; B) Gráfico indicando os resultados obtidos após aplicação dos extratos por 24 h na interação de *C. albicans* e *S. mutans* analisando o biofilme de *S. mutans*; Ca - Grupo controle de *C. albicans*; Ca+Sm – Grupo interação de *C. albicans* com *S. mutans*; PFA – Extrato de *P. paniculata* (pfaffia) nas concentrações de 100, 50 e 25 mg/mL; HAM – Extrato de *H. virginiana* (hamamelis) nas concentrações de 100, 50 e 25 mg/mL; BAR – Extrato de *S. barbatiman* (barbatimão) nas concentrações de 100, 50 e 25 mg/mL; GIM – Extrato de *G. sylvestre* (gimena) nas concentrações de 100, 50 e 25 mg/mL; Letras indicam as diferenças estatisticamente significante (teste de *Kruskal-Wallis* suplementado pelo teste de *Dun's*, $p < 0,05$).

Fonte: Elaborado pelo autor.

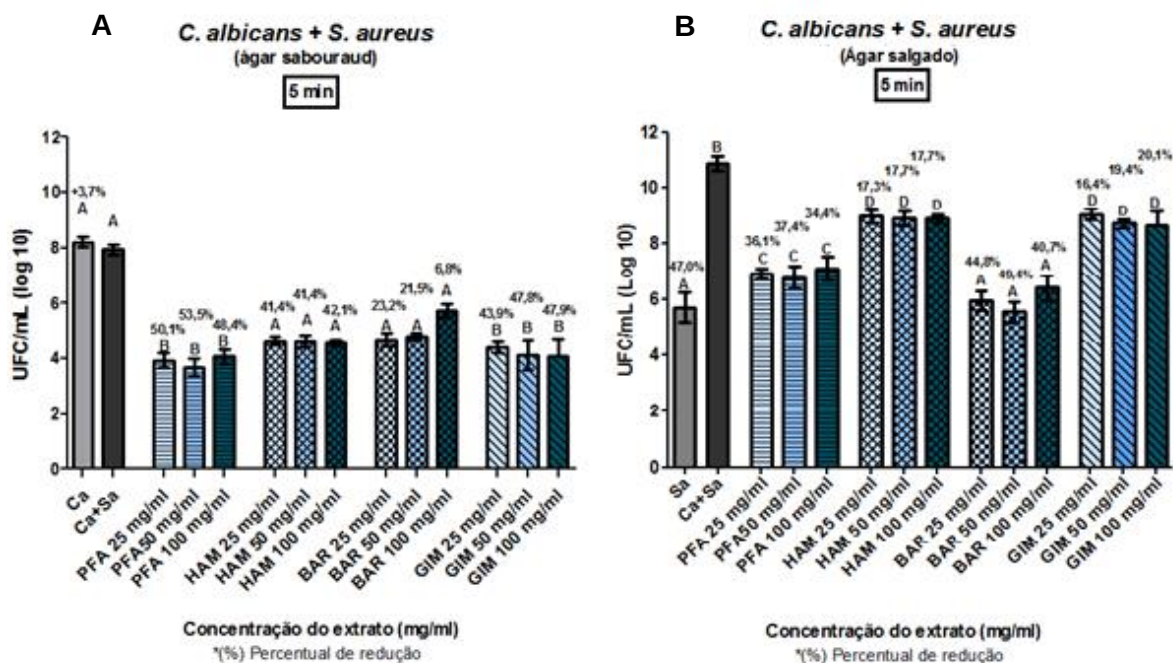
4.2 Biofilme multiespécie de *C. albicans* com *S. aureus*

Para ação dos extratos no biofilme de *C. albicans* pode se observar, na figura 8A, que os extratos de *H. virginiana* (hamamélis) e *S. barbatiman* (barbatimão) nas concentrações de 100, 50 e 25 mg/mL foram estatísticas iguais quando comparados ao grupo controle (Ca+Sa). Os grupos tratados com *G. sylvestre* (gimena) e *P. paniculata* (pfaffia) nas concentrações de 100, 50 e 25 mg/mL, apresentaram reduções estatisticamente significantes ($p < 0,05$) após tratamento no tempo de 5 min.

Analisando os grupos controles (Figura 8B) do biofilme *S. aureus* no tempo de 5 min, pode se observar que a associação de *C. albicans* com *S. aureus* (Ca+Sa) favoreceu o crescimento de *S. aureus* quando comparado com controle de *S. aureus* (Sa) isolado.

Para o grupo tratado no tempo de 5 min, observa-se que o tratamento com extrato de *S. barbatiman* nas concentrações de 100, 50 e 25 mg/mL apresentou maior redução em UFC/mL dos biofilmes de *S. aureus* seguindo do tratamento com *P. paniculata* (pfaffia), *G. sylvestre* (gimena) e *H. virginiana* (hamamélis), quando comparado com o grupo controle (Ca+Sa) ($p < 0,05$).

Figura 8 - Aplicação dos tratamentos por 5 min sobre biofilmes multiespécie de *C. albicans* e *S. aureus*



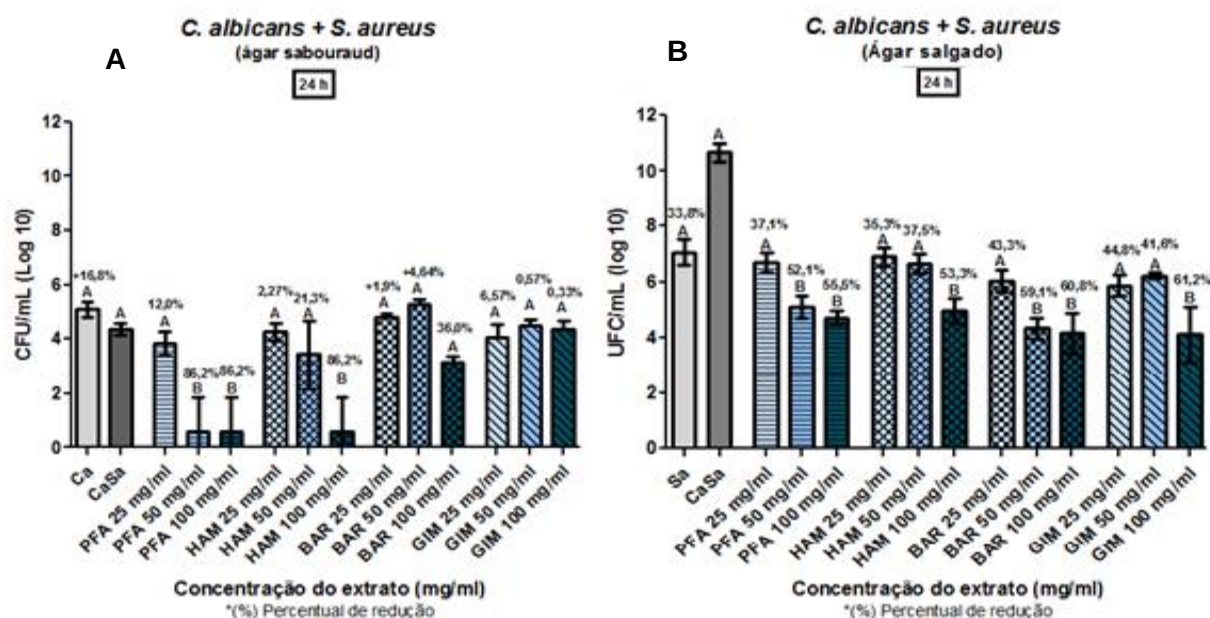
Legenda: A) Gráfico indicando os resultados obtidos após aplicação dos extratos por 5 min na interação de *C. albicans* e *S. aureus* em ágar Sabouraud com Clorafenicol; B) Gráfico indicando os resultados obtidos após aplicação dos extratos por 5 min na interação de *C. albicans* e *S. aureus* em ágar BHI acrescido de NaCl; Ca - Grupo controle de *C. albicans*; Sa - Grupo controle de *S. aureus*; Ca+Sa - Grupo interação de *C. albicans* com *S. aureus*; PFA - Extrato de *P. paniculata* (paffia) nas concentrações de 100, 50 e 25 mg/mL; HAM - Extrato de *H. virginiana* (hamamelis) nas concentrações de 100, 50 e 25 mg/mL; BAR - Extrato de *S. barbatiman* (barbatimão) nas concentrações de 100, 50 e 25 mg/mL; GIM - Extrato de *G. sylvestre* (gimena) nas concentrações de 100, 50 e 25 mg/mL; Letras indicam as diferenças estatisticamente significante (teste de Kruskal-Wallis suplementado pelo teste de Dun's, $p < 0,05$).

Fonte: Elaborado pelo autor.

Os resultados obtidos com a aplicação dos extratos por 24 h (Figura 9A) quando observado o biofilme de *C. albicans*, mostrou que o grupo tratado com extrato de *P. paniculata* (paffia) nas concentrações de 100 e 50 mg/mL e *H. virginiana* (hamamelis) em 100 mg/mL apresentaram redução do biofilme de *C. albicans*, as outras concentrações de *P. paniculata* (paffia) e *H. virginiana* (hamamelis) e as concentrações de 100, 50 e 25 mg/mL de *S. barbatiman* (barbatimão) e *G. sylvestre* (gimena) apresentaram resultados estatisticamente iguais ao grupo controle (Ca+Sa).

No biofilme se *S. aureus* (Figura 9B), observa-se que os extratos de *P. paniculata* (paffia) *S. barbatiman* (barbatimão) nas concentrações de 100 e 50 mg/mL, *H. virginiana* (hamamelis) e *G. sylvestre* (gimena) em 100 mg/mL promoveram reduções com significância estatística ($p < 0,05$). As outras concentrações dos extratos foram estatisticamente iguais ao grupo controle de *S. aureus* associado a com *C. albicans* (Ca+Sa).

Figura 9 - Aplicação dos tratamentos por 24 h sobre biofilmes multiespécie de *C. albicans* e *S. aureus*



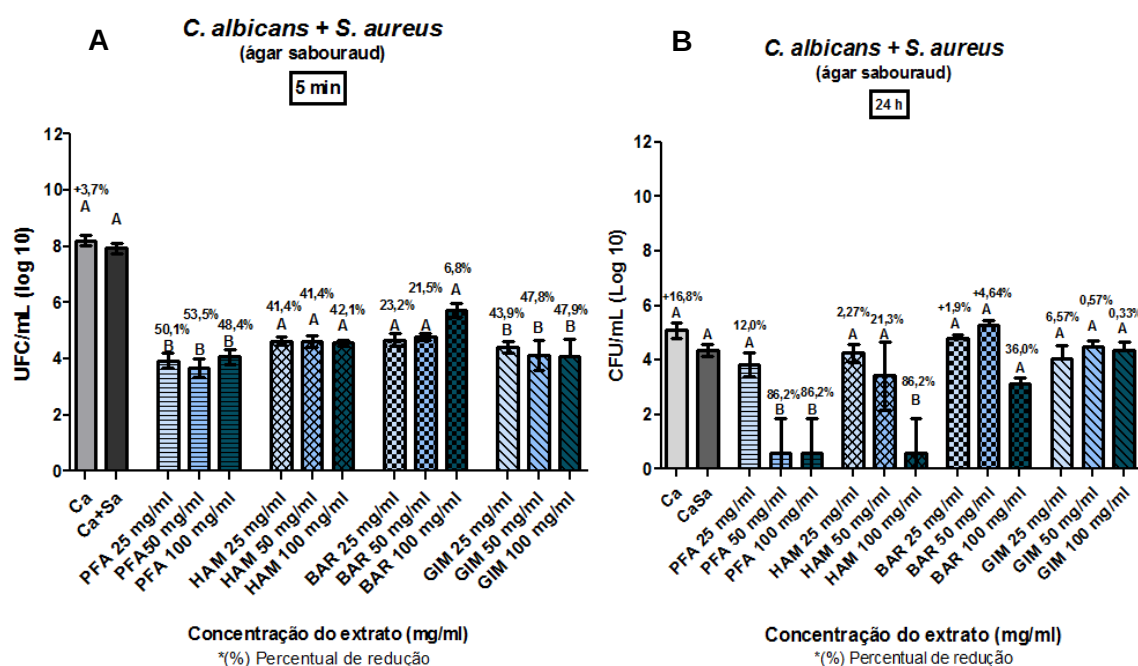
Legenda: A) Gráfico indicando os resultados obtidos após aplicação dos extratos por 24 h na interação de *C. albicans* e *S. aureus* em ágar Sabouraud com Clorafenicol; B) Gráfico indicando os resultados obtidos após aplicação dos extratos por 24 h na interação de *C. albicans* e *S. aureus* ágar BHi acrescido de NaCl; Ca - Grupo controle de *C. albicans*; Sa - grupo controle de *S. aureus*; Ca+Sa - Grupo interação de *C. albicans* com *S. aureus*; PFA - Extrato de *P. paniculata* (paffia) nas concentrações de 100, 50 e 25 mg/mL; HAM - Extrato *H. virginiana* (hamamelis) nas concentrações de 100, 50 e 25 mg/mL; BAR - Extrato de *S. barbatiman* (barbatimão) nas concentrações de 100, 50 e 25 mg/mL; GIM - Extrato de *G. sylvestre* (gimena) nas concentrações de 100, 50 e 25 mg/mL; Letras indicam as diferenças estatisticamente significante (teste de *Kruskal-Wallis* suplementado pelo teste de *Dun's*, $p < 0,05$).

Fonte: Elaborado pelo autor.

Na figura 10A, observa-se que o biofilme de *C. albicans*, no tempo de 5 min, apresentou redução estatisticamente significante ($p < 0,05$) no tratamento dos

extratos de *P. paniculata* (pfaffia) e *G. sylvestre* (gimena) nas três concentrações analisadas neste estudo (100, 50 e 25 mg/mL). Avaliando o tempo de tratamento de 24 h (Figura 10B), observa-se uma redução do biofilme de *C. albicans* estatisticamente significativa ($p < 0,05$) para o tratamento com o extrato de *P. paniculata* (pfaffia) nas concentrações de 100 e 50 mg/mL e para *H. virginiana* (hamamelis) a 100 mg/mL. Os extratos de *barbatiman* (barbatimão), *G. sylvestre* (gimena), *P. paniculata* (pfaffia) a 25 mg/mL e *H. virginiana* (hamamelis) 50 e 25 mg/mL, apresentaram resultados estatisticamente semelhantes ao grupo controle (Ca+Sa). O grupo controle de *C. albicans* com *S. aureus* (Ca+Sa) não apresentou diferença estatística quando comparado com o grupo controle de *C. albicans* (Ca) isolada nos dois tempos de tratamento.

Figura 10 - Aplicação dos tratamentos por 5 min e 24 h sobre biofilmes de *C. albicans*.

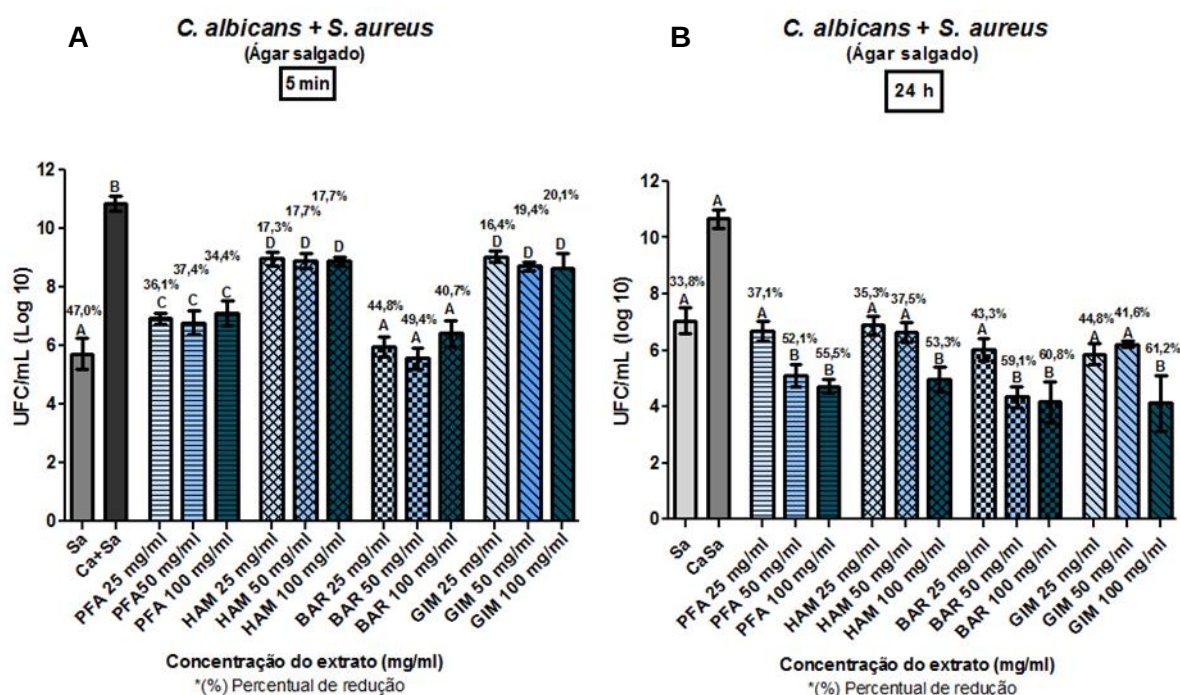


Legenda: A) Gráfico indicando os resultados obtidos após aplicação dos extratos por 5 min na interação de *C. albicans* e *S. aureus*; B) Gráfico indicando os resultados obtidos após aplicação dos extratos por 24 h na interação de *C. albicans* e *S. aureus*; Ca - Grupo controle de *C. albicans*; Ca+Sa - Grupo interação de *C. albicans* com *S. aureus*; PFA - Extrato de *P. paniculata* (pfaffia) nas concentrações de 100, 50 e 25 mg/mL; HAM - Extrato de *H. virginiana* (hamamelis) nas concentrações de 100, 50 e 25 mg/mL; BAR - Extrato de *S. barbatiman* (barbatimão) nas concentrações de 100, 50 e 25 mg/mL; GIM - Extrato de *G. sylvestre* (gimena) nas concentrações de 100, 50 e 25 mg/mL; Letras indicam as diferenças estatisticamente significante (teste de Kruskal-Wallis suplementado pelo teste de Dun's, $p < 0,05$).

Fonte: Elaborado pelo autor.

Analisando o biofilme de *S. aureus*, é possível verificar que o grupo controle de *S. aureus* quando em associação com *C. albicans* (Ca+Sa) no tempo de tratamento de 5 min, promoveu um aumento no crescimento do biofilme de *S. aureus* (Figura 11A) quando comparado com o grupo controle de *S. aureus* (Sa) isolado, mostrando que a associação de *C. albicans* favorece o crescimento de *S.aureus*.

A redução no crescimento do biofilme de *S. aureus*, no tempo de 5 min de tratamento, foi estatisticamente significativa ($p<0,05$) no tratamento com os extratos de *P. paniculata* (pfaffia), *H. virginiana* (hamamelis), *S. barbatiman* (barbatimão) e *G. sylvestre* (gimena) nas três concentrações analisadas (100, 50 e 25 mg/mL). No tempo de tratamento de 24 h (Figura 11B), as reduções do biofilme de *S. aureus* foram observadas nos tratamentos com extratos de *P. paniculata* (pfaffia) e *S. barbatiman* (barbatimão) nas concentrações de 100 e 50 mg/mL, *H. virginiana* (hamamelis) e *G. sylvestre* (gimena) em 100 mg/mL apresentaram reduções estatisticamente significantes ($p<0,05$) quando comparados com grupo controle (Ca+Sa).

Figura 11 - Aplicação dos tratamentos por 5 min e 24 h sobre biofilmes de *S. aureus*

Legenda: A) Gráfico indicando os resultados obtidos após aplicação dos extratos por 5 min na interação de *C. albicans* e *S. aureus*; B) Gráfico indicando os resultados obtidos após aplicação dos extratos por 24 h na interação de *C. albicans* e *S. aureus*; Sa - Grupo controle de *S. aureus*; Ca+Sa – Grupo interação de *C.albicans* com *S. aureus*; PFA – Extrato de *P. paniculata* (pfaffia) nas concentrações de 100, 50 e 25 mg/mL; HAM – Extrato de *H. virginiana* (hamamelis) nas concentrações de 100, 50 e 25 mg/mL; BAR – Extrato de *S. barbatiman* (barbatimão) nas concentrações de 100, 50 e 25 mg/mL; GIM – Extrato de *G. sylvestre* (gimena) nas concentrações de 25, 50 e 100 mg/mL; Letras indicam as diferenças estatisticamente significante (teste de Kruskal-Wallis suplementado pelo teste de Dun's, $p < 0,05$).

Fonte: Elaborado pelo autor.

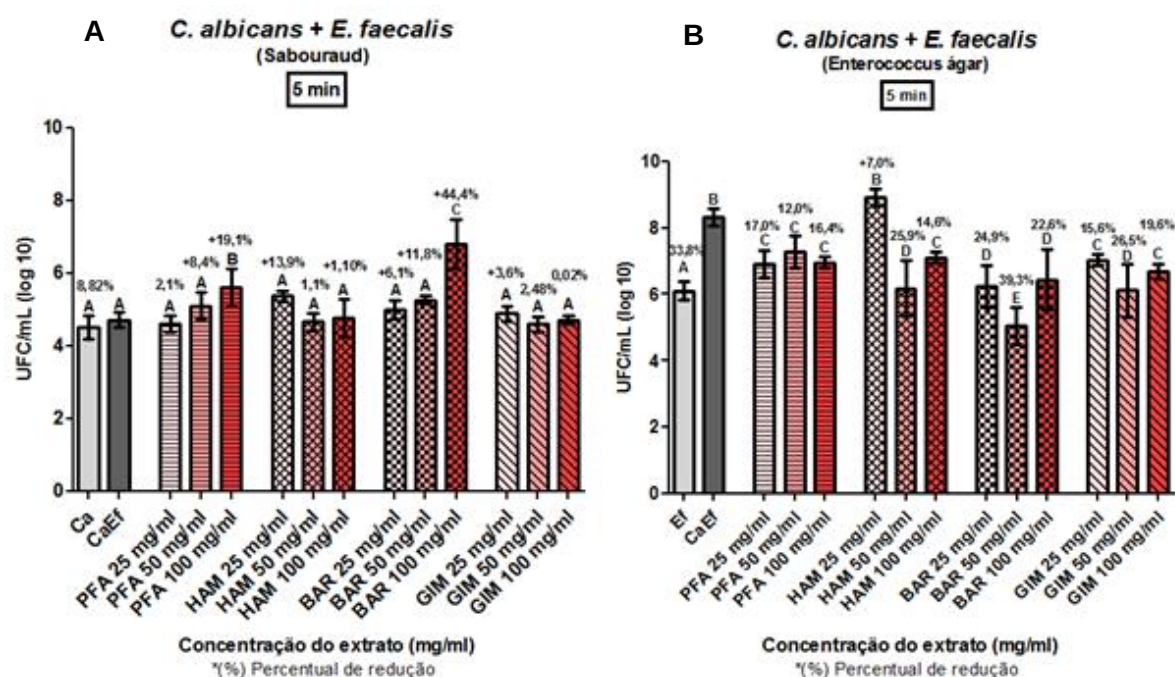
4.3 Biofilme multiespécie de *C. albicans* com *E. faecalis*

Na Figura 12A, observa-se que o biofilme de *C. albicans* não apresentou diferença estatística significativa ($p < 0,05$) dos grupos tratados no tempo de 5 min. Os extratos de *S. barbatiman* (barbatimão) e *P. paniculata* (pfaffia) na concentração de 100 mg/mL apresentaram aumento de UFC/mL quando comparados com grupo controle (Ca+Ef), mostrando que o tratamento favoreceu o crescimento do biofilme da levedura *C. albicans*.

Analisando o biofilme de *E. faecalis* no tempo de 5 min (Figura 12B), observa-se que os extratos de *P. paniculata* (pfaffia), *S. barbatiman* (barbatimão) e *G.*

sylvestre (gimena) apresentaram um percentual de redução em UFC/mL nas concentrações de 100, 50 e 25 mg/mL, enquanto *H. virginiana* (hamamélis) apresentou redução nas concentrações de 100 e 50 mg/mL.

Figura 12 - Aplicação dos tratamentos por 5 min sobre biofilmes multiespécie de *C. albicans* e *E. faecalis*



Legenda: A) Gráfico indicando os resultados obtidos após aplicação dos extratos por 5 min na interação de *C. albicans* e *E. faecalis* em ágar Sabouraud com Clorafenicol; B) Gráfico indicando os resultados obtidos após aplicação dos extratos por 5 min na interação de *C. albicans* e *S. aureus* em Enterococos ágar; Ca - Grupo controle de *C. albicans*; Ef - grupo controle de *E. faecalis*; Ca+Ef - Grupo interação de *C. albicans* com *E. faecalis*; PFA - Extrato de *P. paniculata* (paffia) nas concentrações de 100, 50 e 25 mg/mL; HAM - Extrato de *H. virginiana* (hamamelis) nas concentrações de 100, 50 e 25 mg/mL; BAR - Extrato de *S. barbatiman* (barbatimão) nas concentrações de 100, 50 e 25 mg/mL; GIM - Extrato de *G. sylvestre* (gimena) nas concentrações de 100, 50 e 25 mg/mL; Letras indicam as diferenças estatisticamente significante (teste de *Kruskal-Wallis* suplementado pelo teste de *Dun's*, $p < 0,05$).

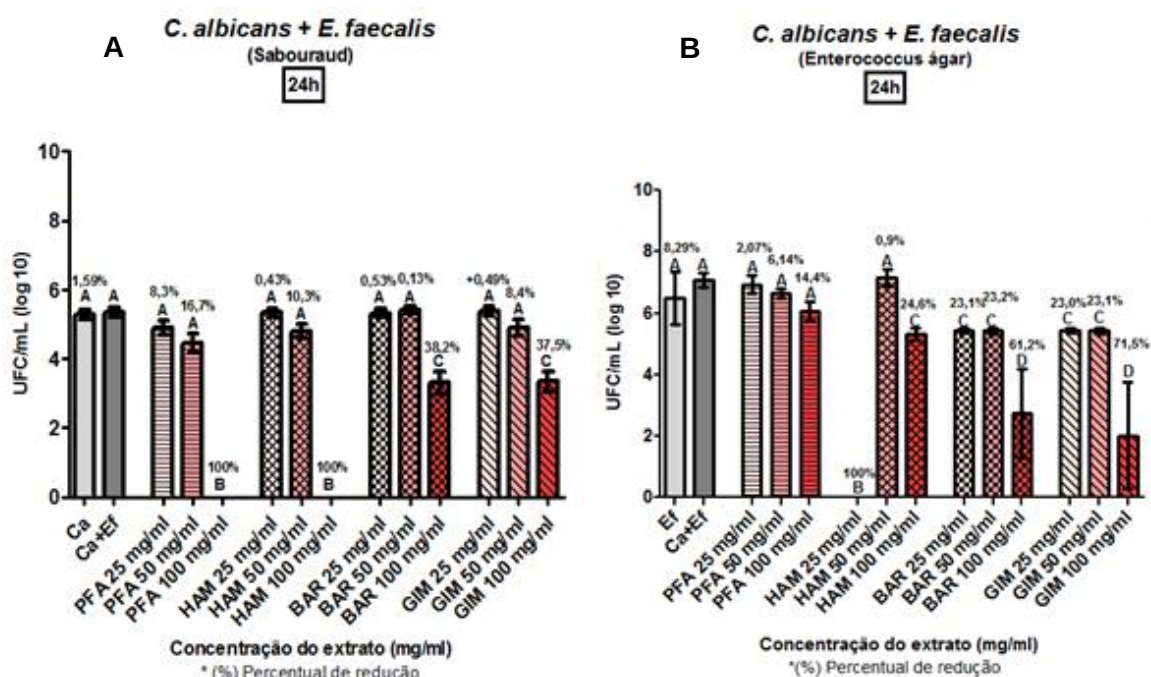
Fonte: Elaborado pelo autor.

Na figura 13A, analisando o biofilme de *C. albicans*, no tempo de tratamento de 24 h, os extratos de *P. paniculata* (paffia), *H. virginiana* (hamamelis), *S. barbatiman* (barbatimão) e *G. sylvestre* (gimena), nas concentrações de 100 mg/mL, apresentaram redução do biofilme estatisticamente significantes ($p > 0,05$), quando comparadas com grupo controle (Ca+Ef), sendo que os extratos de *P. paniculata*

(pfaflia) e *H. virginiana* (hamamelis) na concentração de 100 mg/mL apresentaram reduções de 100% do biofilme.

Quando observamos a formação de biofilme de *E. faecalis*, na figura 13B, verifica-se no tempo de tratamento de 24h, os extratos de *H. virginiana* (hamamelis) nas concentrações de 100 e 25 mg/mL, *S. barbatiman* (barbatimão) e *G. sylvestre* (gimena) nas concentrações de 100, 50 e 25 mg/mL apresentaram redução no crescimento do biofilme estatisticamente significativa ($p < 0.05$). O extrato de *H. virginiana* (hamamelis) na concentração de 25 mg/mL, exibiu a maior redução do biofilme (100%), quando comparada com o grupo controle (Ca+Ef) e com o tratamento com os outros extratos.

Figura 13: Aplicação dos tratamentos por 24 h sobre biofilmes multiespécie de *C. albicans* e *E. faecalis*.



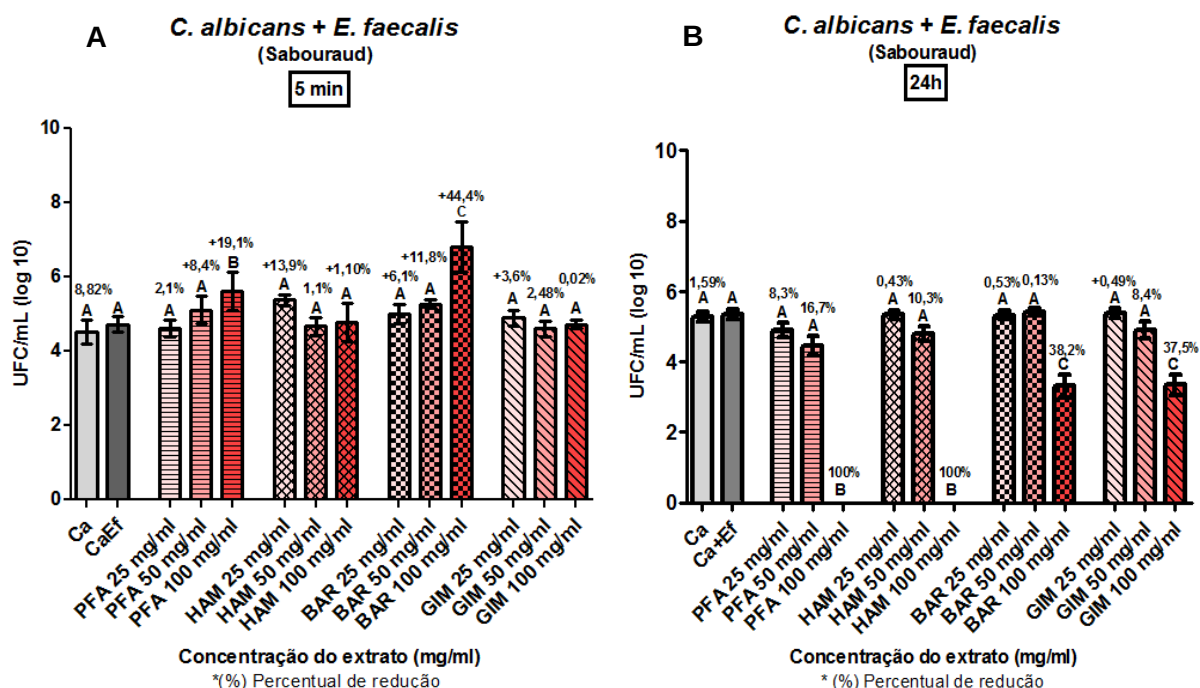
Legenda: A- Gráfico indicando os resultados obtidos após aplicação dos extratos por 24 h na interação de *C. albicans* e *E. faecalis* em ágar Sabouraud com Clorafenicol; B- Gráfico indicando os resultados obtidos após aplicação dos extratos por 24 h na interação de *C. albicans* e *S. aureus* em Enterococos ágar; Ca - Grupo controle de *C. albicans*; Ef - grupo controle de *E. faecalis*; Ca+Ef - Grupo interação de *C. albicans* com *E. faecalis*; PFA - Extrato de *P. paniculata* (pfaflia) nas concentrações de 100, 50 e 25 mg/mL; HAM - Extrato de *H. virginiana* (hamamelis) nas concentrações de 100, 50 e 25 mg/mL; BAR - Extrato de *S. barbatiman* (barbatimão) nas concentrações de 100, 50 e 25 mg/mL; GIM - Extrato de *G. sylvestre* (gimena) nas concentrações de 100, 50 e 25 mg/mL; Letras indicam as diferenças estatisticamente significante (teste de *Kruskal-wallis* suplementado pelo teste de *Dun's*, $p < 0.05$).

Fonte: Elaborado pelo próprio autor.

Quando analisado o biofilme de *C.albicans* (Ca), é possível observar que no tempo de 5 min (Figura 14A), os grupos tratados com extratos nas concentrações de 100, 50 e 25 mg/mL obtiveram resultados estatisticamente iguais entre si e quando comparados com os grupos controles (Ca e Ca+Ef), com exceção do tratamento com os extratos de *P. paniculata* (paffia) e *S. barbatiman*, em que na concentração de 100 mg/mL apresentaram aumento no crescimento do biofilme de *C. albicans*.

No tempo de 24 h (Figura 14B), os extratos de *P. paniculata* (paffia), *H. virginiana* (hamamelis), *S. barbatiman* (barbatimão) e *G. sylvestre* (gimena) na concentração de 100 mg/mL apresentaram reduções no crescimento do biofilme de *C. albicans* ($p<0,05$). Estes mesmos extratos nas concentrações de 25 e 50 mg/mL, não apresentaram diferença estatística significativa ($p<0,05$) quando comparados com o grupo controle de *C. albicans* com *E. faecalis* (Ca+Ef).

Figura 14 -Aplicação dos tratamentos por 5 min e 24 h sobre biofilmes de *C. albicans*



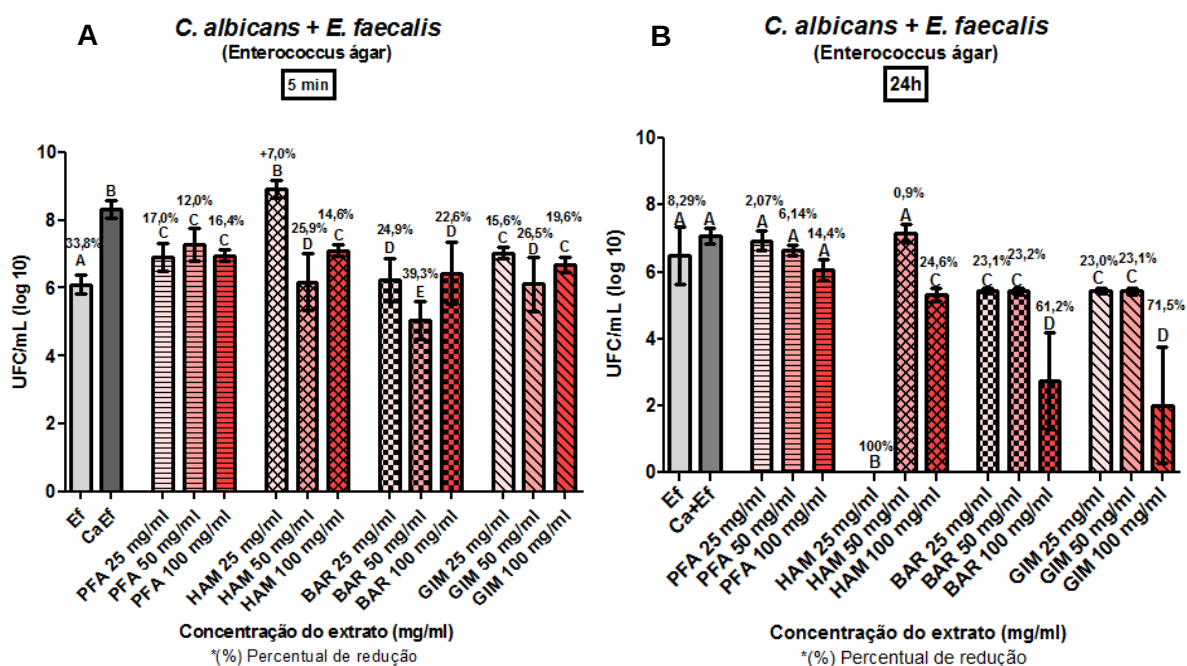
Legenda: A- Gráfico indicando os resultados obtidos após aplicação dos extratos por 5 min na interação de *C. albicans* e *E. faecalis*; B- Gráfico indicando os resultados obtidos após aplicação dos extratos por 24 h na interação de *C. albicans* e *E. faecalis*; Ca - Grupo controle de *C. albicans*; Ca+Ef – Grupo interação de *C.albicans* com *E. faecalis*; PFA – Extrato de *P. paniculata* (paffia) nas concentrações de 100, 50 e 25 mg/mL; HAM – Extrato de *H. virginiana* (hamamelis) nas concentrações de 100, 50 e 25 mg/mL; BAR – Extrato de *S. barbatiman* (barbatimão) nas concentrações de 100, 50 e 25 mg/mL; GIM – Extrato de *G. sylvestre* (gimena) nas concentrações de 100, 50 e 25 mg/mL; Letras indicam as diferenças estatisticamente significante (teste de *Kruskal-wallis* suplementado pelo teste de *Dun's*, $p<0,05$).

Fonte: Elaborado pelo autor.

Na figura 15A, podemos observar que o tratamento no tempo de 5 min com os extratos de *P. paniculata* (pfaffia), *S. barbatiman* (barbatimão) e *G. sylvestre* (gimena) nas concentrações de 100, 50 e 25 mg/mL e *H. virginiana* (hamamelis) a 100 e 50 mg/mL, apresentaram um percentual de redução no biofilme de *E. faecalis* estatisticamente significativo ($p < 0,05$). Verificando o biofilme do grupo controle, observa-se que um favorecimento no crescimento do biofilme de *E. faecalis* quando em associação com *C. albicans* quando comparado com *E. faecalis* (Ef) isolado.

No tempo de 24 h (Figura 15B), o extrato de *H. virginiana* (hamamelis) na concentração de 25 mg/mL apresentou uma maior redução (100%) no biofilme de *E. faecalis*, quando comparado com as outras concentrações (50 e 100 mg/mL) do mesmo extrato. Os extratos de *S. barbatiman* (barbatimão) e *G. sylvestre* (gimena) mostraram maior redução do biofilme na concentração de 100 mg/mL.

Figura 15 - Aplicação dos tratamentos por 5 min e 24 h sobre biofilmes de *E. faecalis*



Legenda: A) Gráfico indicando os resultados obtidos após aplicação dos extratos por 5 min na interação de *C. albicans* e *E. faecalis*; B) Gráfico indicando os resultados obtidos após aplicação dos extratos por 24 h na interação de *C. albicans* e *E. faecalis*; Ef - Grupo controle de *E. faecalis*; Ca+Ef – Grupo interação de *C. albicans* com *E. faecalis*; PFA – Extrato de *P. paniculata* (pfaffia) nas concentrações de 100, 50 e 25 mg/mL; HAM – Extrato de *H. virginiana* (hamamelis) nas concentrações de 100, 50 e 25 mg/mL; BAR – Extrato de *S. barbatiman* (barbatimão) nas concentrações de 100, 50 e 25 mg/mL; GIM – Extrato de *G. sylvestre* (gimena) nas concentrações de 100, 50 e 25 mg/mL; Letras indicam as diferenças estatisticamente significante (teste de Kruskal-wallis suplementado pelo teste de Dun's, $p < 0,05$).

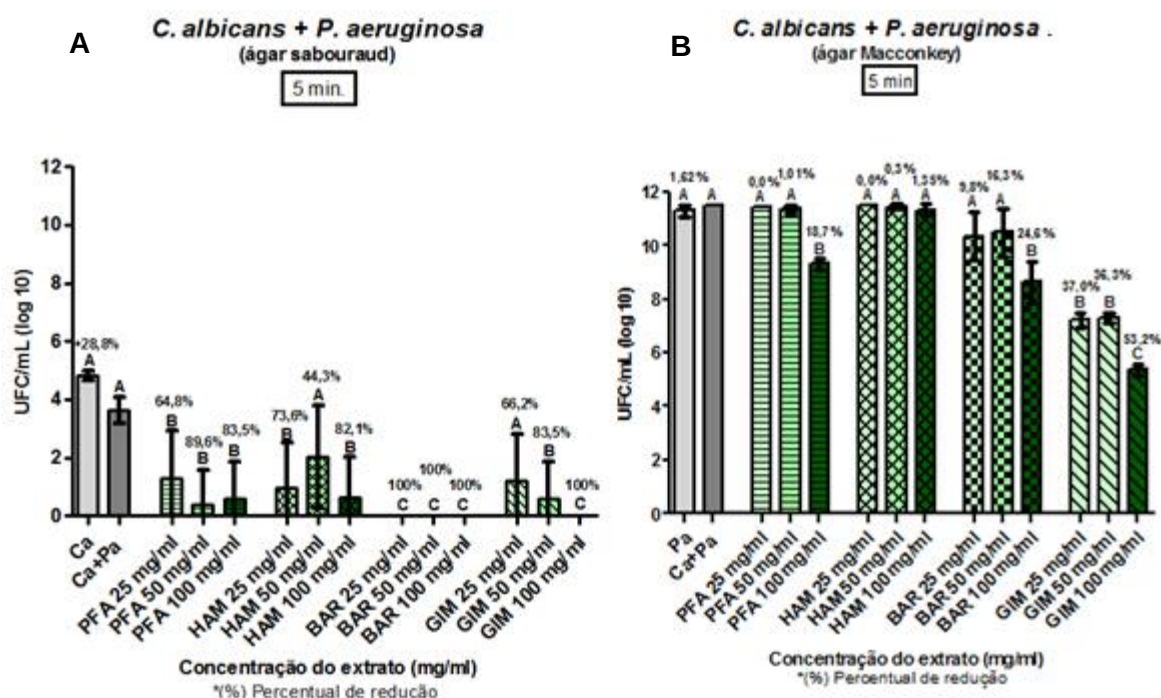
Fonte: Elaborado pelo autor.

4.4 Biofilme multiespécie de *C. albicans* com *P. aeruginosa*

No tempo de tratamento de 5 min (Figura 16A), o tratamento do biofilme de *C. albicans* com os quatro extratos analisados neste estudo, mostraram reduções na contagem de UFC/mL estatisticamente significantes ($p < 0,05$). Uma redução de 100% do biofilme de *C. albicans* foi observada no tratamento com extrato de *S. barbatiman* (barbatimão) nas concentrações de 100, 50 e 25 mg/mL e *G. sylvestre* (gimena) na concentração de 100 mg/mL.

Analisando o biofilme de *P. aeruginosa* (Figura 16B), observa-se que os extratos de *P. paniculata* (pfaffia) e *S. barbatiman* (barbatimão) apresentaram redução do biofilme de *P. aeruginosa* na concentração de 100 mg/mL, enquanto *G. sylvestre* (gimena) apresentou redução nas concentrações de 100, 50 e 25 mg/mL.

Figura 16 - Aplicação dos tratamentos por 5 min sobre biofilmes multiespécie de *C. albicans* e *P. aeruginosa*



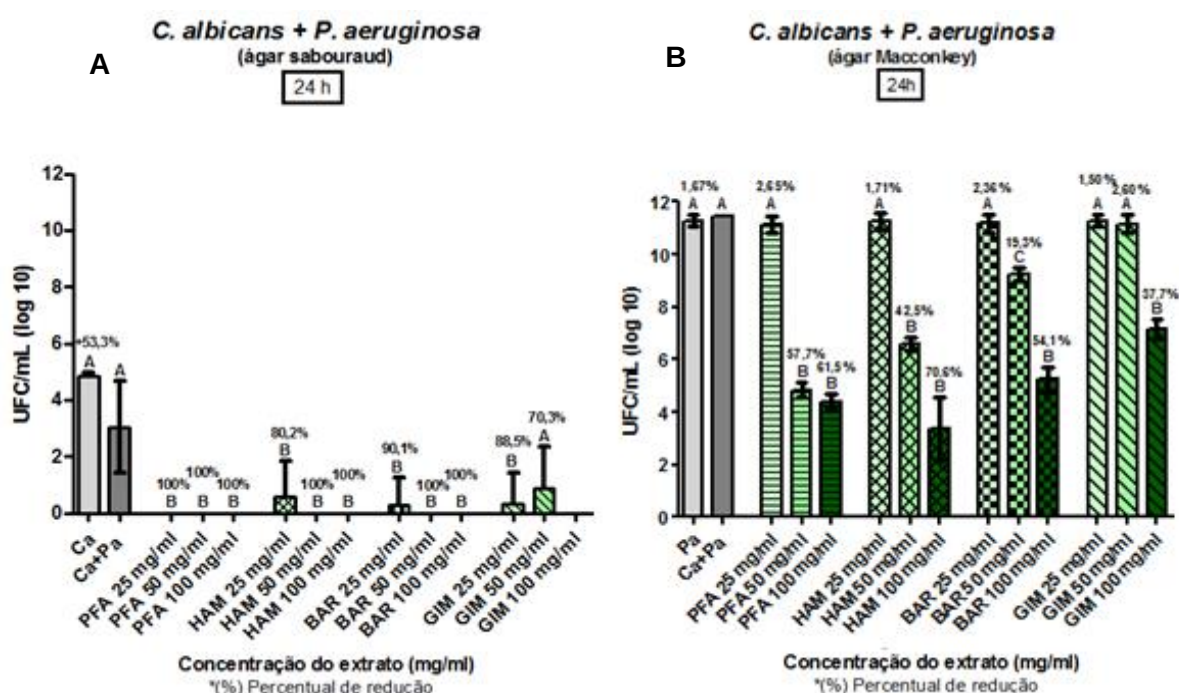
Legenda: A) Resultados obtidos após aplicação dos extratos por 5 min na interação de *C. albicans* e *P. aeruginosa* em ágar Sabouraud com Clorafenicol; B) Resultados obtidos após aplicação dos extratos por 5 min na interação de *C. albicans* e *P. aeruginosa* em ágar MacConkey; Ca - Grupo controle de *C. albicans*; Pa - grupo controle de *P. aeruginosa*; Ca+Pa - Grupo interação de *C. albicans* com *P. aeruginosa*; PFA - Extrato de *P. paniculata* (pfaffia) nas concentrações de 100, 50 e 25 mg/mL; HAM - Extrato de *H. virginiana* (hamamelis) nas concentrações de 100, 50 e 25 mg/mL; BAR - Extrato de *S. barbatiman* (barbatimão) nas concentrações de 100, 50 e 25 mg/mL; GIM - Extrato de *G. sylvestre* (gimena) nas concentrações de 100, 50 e 25 mg/mL; Letras indicam as diferenças estatisticamente significantes (teste de Kruskal-Wallis suplementado pelo teste de Dun's, $p < 0,05$).

Fonte: Elaborado pelo autor.

No tempo de 24 h, a redução do biofilme de *C. albicans* foi de 100% para o extrato de *P. paniculata* (pfaffia), nas concentrações de 100, 50 e 25 mg/mL, para *H. virginiana* (hamamelis) e *S. barbatiman* (barbatimão) a 50 e 100 mg/mL e para *G. sylvestre* (gimena) a 100 mg/mL. As demais concentrações dos extratos também apresentaram significativa redução no biofilme de *C. albicans* ($p<0,05$) (Figura 17A).

Quando avaliamos o crescimento de *P. aeruginosa* no tempo de 24 h (Figura 17B), os tratamentos com extratos mostraram percentual de redução do biofilme estatisticamente significativo ($p<0,05$) nas concentrações de 50 e 100 mg/mL para os extratos de *P. paniculata* (pfaffia), *H. virginiana* (hamamélis), *S. barbatiman* (barbatimão) e de 100 mg/mL para o extrato de *G. sylvestre* (gimena) ($p<0,05$).

Figura 17- Aplicação dos tratamentos por 24 h sobre biofilmes multiespécie de *C. albicans* e *P. aeruginosa*

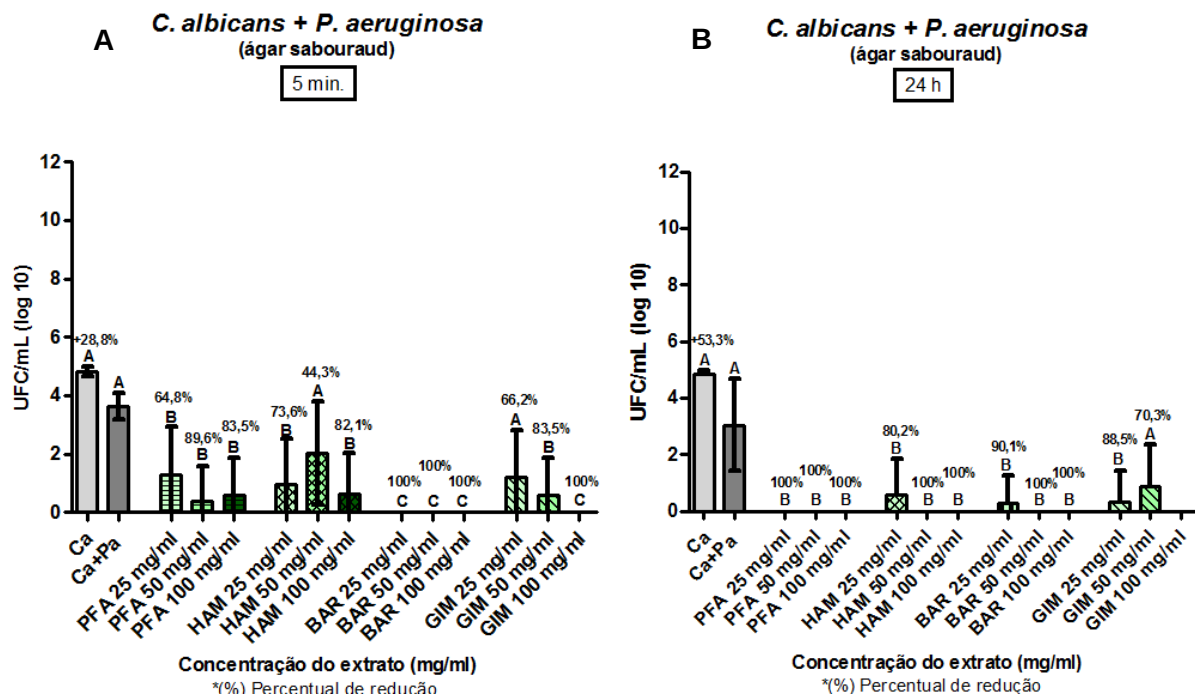


Legenda: A) Gráfico indicando os resultados obtidos após aplicação dos extratos por 24 h na interação de *C. albicans* e *P. aeruginosa* em ágar Sabouraud com Clorafenicol; B) Gráfico indicando os resultados obtidos após aplicação dos extratos por 24 h na interação de *C. albicans* e *P. aeruginosa* em ágar MacConkey; Ca - Grupo controle de *C. albicans*; Pa - grupo controle de *P. aeruginosa*; Ca+Pa - Grupo interação de *C. albicans* com *P. aeruginosa*; PFA - Extrato de *P. paniculata* (pfaffia) nas concentrações de 100, 50 e 25 mg/mL; HAM - Extrato de *H. virginiana* (hamamelis) nas concentrações de 100, 50 e 25 mg/mL; BAR - Extrato de *S. barbatiman* (barbatimão) nas concentrações de 100, 50 e 25 mg/mL; GIM - Extrato de *G. sylvestre* (gimena) nas concentrações de 100, 50 e 25 mg/mL; Letras indicam as diferenças estatisticamente significante (teste de Kruskal-Wallis suplementado pelo teste de Dun's, $p<0,05$).

Fonte: Elaborado pelo autor.

Quando analisado o biofilme de *C. albicans* nos tempos de 5 min e 24 h (Figura 18), observou-se que o tratamento com os extratos de *P. paniculata* (pfaffia), *H. virginiana* (hamamelis), *G. sylvestre* (gimena) e *S. barbatiman* (barbatimão) apresentaram significativa redução de UFC/mL em ambos os tempos analisados neste estudo. O extrato de *S. barbatiman* (barbatimão) a 100 e 50 mg/mL e *G. sylvestre* (gimena) a 100 mg/mL apresentaram redução de 100% do biofilme de *C. albicans* nos dois tempos analisados. No tempo de 24 h (Figura 18B), o extrato de *P. paniculata* (pfaffia) nas concentrações de 25, 50 e 100 mg/mL e *H. virginiana* (hamamelis) em 50 e 100 mg/mL apresentaram redução de 100%, mostrando que no tempo de tratamento de 24 h estes dois extratos apresentaram maior redução do biofilme de *C. albicans* quando comparados com o tempo de tratamento de 5 min (Figura 18A).

Figura 18 - Aplicação dos tratamentos por 5 min e 24 h sobre biofilmes de *C. albicans*



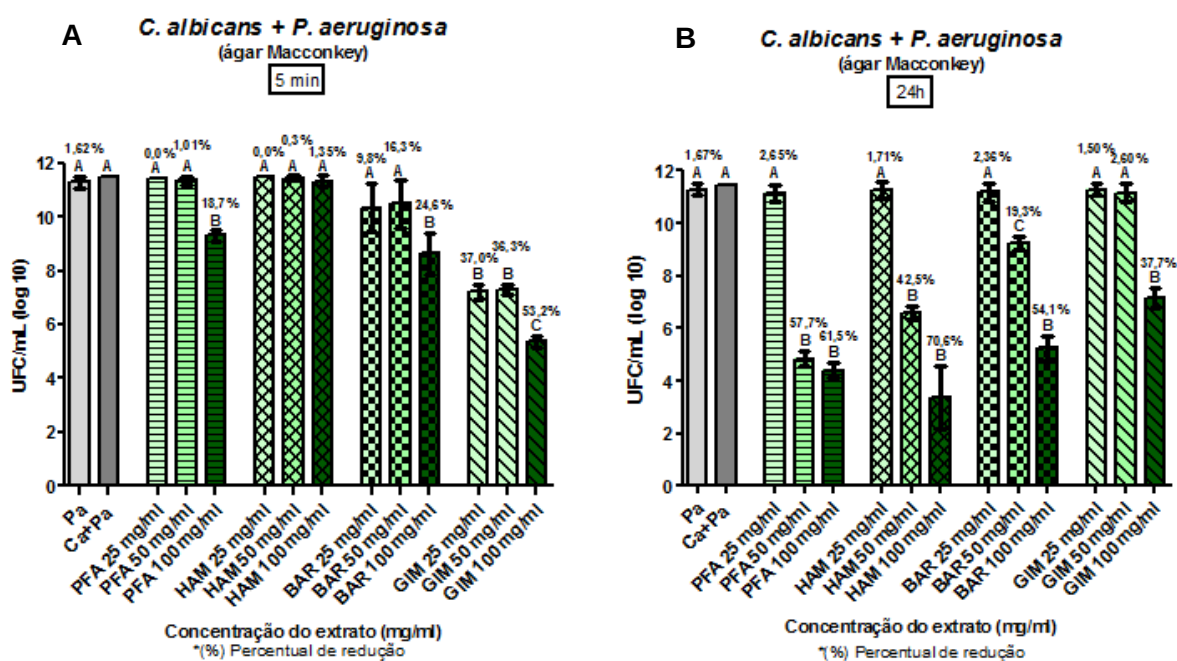
Legenda: A) Gráfico indicando os resultados obtidos após aplicação dos extratos por 5 min na interação de *C. albicans* e *P. aeruginosa*; B) Gráfico indicando os resultados obtidos após aplicação dos extratos por 24 h na interação de *C. albicans* e *P. aeruginosa*; Ca - Grupo controle de *C. albicans*; Ca+Pa - Grupo interação de *C. albicans* com *P. aeruginosa*; PFA - Extrato de *P. paniculata* (pfaffia) nas concentrações de 100, 50 e 25 mg/mL; HAM - Extrato de *H. virginiana* (hamamelis) nas concentrações de 100, 50 e 25 mg/mL; BAR - Extrato de *S. barbatiman* (barbatimão) nas concentrações de 100, 50 e 25 mg/mL; GIM - Extrato de *G. sylvestre* (gimena) nas concentrações de 100, 50 e 25 mg/mL; Letras indicam as diferenças estatisticamente significante (teste de Kruskal-Wallis suplementado pelo teste de Dun's, $p < 0,05$).

Fonte: Elaborado pelo autor.

Observando o biofilme de *P. aeruginosa* no tempo de 5 min (Figura 19A), o extrato de *P. paniculata* (pfaffia) e *S. barbatiman* (barbatimão) na concentração de 100 mg/mL e *G. sylvestre* (gimena) a 100, 50 e 25 mg/mL apresentaram uma maior redução do biofilme, quando comparado com as outras concentrações dos extratos.

Ao observar o gráfico no tempo de 24 h (Figura 19B), *G. sylvestre* (gimena) apresentou redução do biofilme de *P. aeruginosa* somente na concentração de 100 mg/mL. Os extratos de *P. paniculata* (pfaffia), *H. virginiana* (hamamelis) e *S. barbatiman* (barbatimão) nas concentrações de 100 e 50 mg/mL mostraram maiores reduções quando comparados com o tratamento de 5 min.

Figura 19 - Aplicação dos tratamentos por 5 min e 24 h sobre biofilmes de *P. aeruginosa*



Legenda: A) Gráfico indicando os resultados obtidos após aplicação dos extratos por 5 min na interação de *C. albicans* e *P. aeruginosa*; B) Gráfico indicando os resultados obtidos após aplicação dos extratos por 24 h na interação de *C. albicans* e *P. aeruginosa*; Pa - Grupo controle de *P. aeruginosa*; Ca+Pa - Grupo interação de *C. albicans* com *P. aeruginosa*; PFA - Extrato de *P. paniculata* (pfaffia) nas concentrações de 25, 50 e 100 mg/mL; HAM - Extrato de *H. virginiana* (hamamelis) nas concentrações de 25, 50 e 100 mg/mL; BAR - Extrato de *S. barbatiman* (barbatimão) nas concentrações de 25, 50 e 100 mg/mL; GIM - Extrato de *G. sylvestre* (gimena) nas concentrações de 25, 50 e 100 mg/mL; Letras indicam as diferenças estatisticamente significante (teste de Kruskal-Wallis suplementado pelo teste de Dun's, $p < 0,05$) entre os grupos.

Fonte: Elaborado pelo autor

Os quadros 3, 4, 5 e 6 apresentam a ação dos extratos nas interações dos biofilmes (*C. albicans* com as bactérias e das bactérias com *C. albicans*), em que **P**, foi o resultado positivo obtido para a redução do biofilme multiespécie, em todas ou alguma das concentrações (100, 50 e 25 mg/mL) após o tratamento com os extratos no tempo de 5 min e 24 h. As outras interações não obtiveram redução no biofilme após o tratamento com os extratos analisados neste estudo.

Quadro 3 - Ação do extrato de *P. paniculata* (pfaffia) em biofilme multiespécie, nos tempos de 5 min e 24 h

<i>Pfaffia paniculata</i>	Interação	Ação		Interação	Ação	
		5 min	24 h		5 min	24 h
	<i>C. albicans</i> + <i>S. mutans</i>	-	P	<i>S. mutans</i> + <i>C. albicans</i>	P	P
	<i>C. albicans</i> + <i>S. aureus</i>	P	P	<i>S. aureus</i> + <i>C. albicans</i>	P	P
	<i>C. albicans</i> + <i>E. faecalis</i>	-	P	<i>E. faecalis</i> + <i>C. albicans</i>	P	-
	<i>C. albicans</i> + <i>P. aeruginosa</i>	P	P	<i>P. aeruginosa</i> + <i>C. albicans</i>	P	P

Legenda: **P**: resultado positivo, em que o extrato apresentou redução do biofilme em alguma ou todas concentrações.

Fonte: Elaborado pelo autor.

Quadro 4 - Ação do extrato de *H. virginiana* (hamamelis) em biofilme multiespécie, nos tempos de 5 min e 24 h

<i>Hamamelis virginiana</i>	Interação	Ação		Interação	Ação	
		5 min	24 h		5 min	24 h
	<i>C. albicans</i> + <i>S. mutans</i>	-	P	<i>S. mutans</i> + <i>C. albicans</i>	-	P
	<i>C. albicans</i> + <i>S. aureus</i>	P	P	<i>S. aureus</i> + <i>C. albicans</i>	P	P
	<i>C. albicans</i> + <i>E. faecalis</i>	-	P	<i>E. faecalis</i> + <i>C. albicans</i>	P	P
	<i>C. albicans</i> + <i>P. aeruginosa</i>	P	P	<i>P. aeruginosa</i> + <i>C. albicans</i>	-	P

Legenda: **P**: resultado positivo, em que o extrato apresentou redução do biofilme em alguma ou todas concentrações.

Fonte: Elaborado pelo autor.

Quadro 5 - Ação do extrato de *S. barbatimam* (barbatimão) em biofilme multiespécie, nos tempos de 5 min e 24 h

<i>Stryphnodendron barbatimam</i>	Interação	Ação		Interação	Ação	
		5 min	24 h		5 min	24 h
	<i>C. albicans</i> + <i>S. mutans</i>	-	P	<i>S. mutans</i> + <i>C. albicans</i>	P	P
	<i>C. albicans</i> + <i>S. aureus</i>	P	-	<i>S. aureus</i> + <i>C. albicans</i>	P	P
	<i>C. albicans</i> + <i>E. faecalis</i>	-	P	<i>E. faecalis</i> + <i>C. albicans</i>	P	P
	<i>C. albicans</i> + <i>P. aeruginosa</i>	P	P	<i>P. aeruginosa</i> + <i>C. albicans</i>	P	P

Legenda: P: resultado positivo, em que o extrato apresentou redução do biofilme em alguma ou todas concentrações.

Fonte: Elaborado pelo autor.

Quadro 6 - Ação do extrato de *G. sylvestre* (gimena) em biofilme multiespécie, nos tempos de 5 min e 24 h

<i>Gymnena sylvestre</i>	Interação	Ação		Interação	Ação	
		5 min	24 h		5 min	24 h
	<i>C. albicans</i> + <i>S. mutans</i>	-	P	<i>S. mutans</i> + <i>C. albicans</i>	P	P
	<i>C. albicans</i> + <i>S. aureus</i>	P	-	<i>S. aureus</i> + <i>C. albicans</i>	P	P
	<i>C. albicans</i> + <i>E. faecalis</i>	-	P	<i>E. faecalis</i> + <i>C. albicans</i>	P	P
	<i>C. albicans</i> + <i>P. aeruginosa</i>	P	P	<i>P. aeruginosa</i> + <i>C. albicans</i>	P	P

Legenda: P: resultado positivo, em que o extrato apresentou redução do biofilme em alguma ou todas concentrações.

Fonte: Elaborado pelo autor.

5 DISCUSSÃO

O biofilme é caracterizado por ser uma estrutura complexa, onde a interação de várias espécies microbianas vive em equilíbrio mesmo em condições adversas (Gholami et al., 2017), promovendo o crescimento e a proteção dos micro-organismos a agentes antimicrobianos (Tomé et al., 2017). Além das características do biofilme, desde a descoberta da penicilina, o uso do antibiótico tem sido um dos mais importantes medicamentos alopáticos no combate as infecções bacterianas para saúde do homem, entretanto seu uso indiscriminado tem comprometido sua ação terapêutica, levando à resistência antimicrobiana e diminuindo as possibilidades das terapias medicamentosas (Arora, Sood, 2017). As plantas medicinais têm sido administradas por décadas no tratamento efetivo de doenças, e estudos que explorem suas propriedades antimicrobianas são necessários para que possamos usá-las como alternativa medicamentosa na saúde mundial. Este estudo avaliou a ação antimicrobiana, pela contagem de UFC/mL ($\log_{10}$), dos extratos de *P. paniculata* (pfaffia), *H. virginiana* (hamamelis), *S. barbatiman* (barbatimão) e *G. sylvestre* (gimena) sobre os biofilmes heterotípicos de *C. albicans* em associação com *S. mutans*, *S. aureus*, *E. faecalis* e *P. aeruginosa* nos períodos de tratamento de 5 min e 24 h, e foram obtidos resultados positivos.

C. albicans é um micro-organismo oportunista que está presente na microbiota humana, e na cavidade bucal pode causar infecção conhecida como candidose (Feldman et al., 2017; Ozel et al., 2017). Estudos relataram a sua relação com a cárie dentária em associação com *S. mutans*, uma das principais bactérias relacionadas a formação da cárie dentária (Pereira CA et al., 2013; Krzyściak et al., 2017). A associação de *C. albicans* com outros estreptococos em biofilme pode promover o crescimento de hifas de *C. albicans* (Feldman et al., 2017).

Analisando os resultados obtidos neste estudo, no tratamento da interação de *C. albicans* com *S. mutans*, o extrato de *P. paniculata* (pfaffia) no tempo de 5 min não mostrou resultados estatisticamente significativos, porém, no tempo de 24 h quando analisado o crescimento de *C. albicans*, este extrato mostrou redução nas três concentrações avaliadas, sendo que em 100 mg/mL mostrou redução de 100%. Quando observado o biofilme de *S. mutans* em associação a *C. albicans*, foi

observado que no tempo de 24 h, *S. mutans* apresentou resultados significativos e na redução de UFC/mL nas três concentrações analisadas (100, 50 e 25 mg/mL). O estudo de Sampaio et al. (2009) avaliaram a atividade antimicrobiana do extrato de *Caesalpinia ferrea* Martius contra patógenos bucais e observaram que o extrato promoveu a ação antimicrobiana nos micro-organismos *in vitro* na forma planctônica e em biofilme multiespécie, entre eles *C. albicans* e *S. mutans*.

Na associação de *C. albicans* com *S. aureus* e de *S. aureus* com *C. albicans*, no tempo tratamento de 5 min com extrato de *P. paniculata* (pfaffia), mostrou redução no crescimento do biofilme das duas espécies nas concentrações de 100, 50 e 25 mg/mL. No tempo de 24 h, foi observada redução tanto no biofilme de *C. albicans* como de *S. aureus* nas concentrações de 100 e 50 mg/mL. Essa ação antimicrobiana de *S. aureus* e *C. albicans* foi observada no estudo de Marwa et al. (2017), que avaliaram a ação antimicrobiana do óleo essencial de *Mentha piperita* contra sete bactérias e dois fungos e constataram que o óleo essencial apresentou ação antimicrobiana em bactérias Gram-positivas, entre elas *S. aureus*, e também de levedura *C. albicans*.

Em relação ao biofilme de *C. albicans* quando associado a *E. faecalis*, no tratamento com o extrato de *P. paniculata* (pfaffia) no tempo de 5 min, este estudo verificou que, o extrato favoreceu o crescimento em UFC/mL de *C. albicans*, na concentração de 100 mg/mL, e no tempo de 24 h, a redução foi de 100% do biofilme nesta mesma concentração, pressupondo que o tempo de 5 min não foi suficiente para que esse extrato pudesse agir sobre a levedura. No tratamento do biofilme de *E. faecalis* quando associado a *C. albicans*, o mesmo apresentou redução estatisticamente significativa ($p < 0,05$) quando observado no tempo de 5 min. Nos estudos de Volpato et al. (2017), foi examinado a atividade antimicrobiana do extrato de *Persea major* através da determinação da concentração inibitória mínima (CIM) em que as células bacterianas ficaram em contato com extrato por 24 h. Os autores relataram que o extrato bruto não mostrou atividade antimicrobiana, o mesmo observamos neste estudo, uma vez que *E. faecalis* quando tratado com extrato de *P. paniculata* (pfaffia) no tempo de 24 h também não apresentou atividade antimicrobiana.

Analisando os efeitos do extrato de *P. paniculata* (pfaffia) sobre o biofilme de *C. albicans* em associação com *P. aeruginosa* no tempo de tratamento de 5 min,

observou-se que o tratamento com extrato apresentou redução do biofilme de *C. albicans* nas concentrações de 25, 50 e 100 mg/mL, e no tempo de 24 h, redução de UFC/mL ($\log_{10}$) foi de em 100% nas três concentrações analisadas. No tratamento do biofilme de *P. aeruginosa* associado com *C. albicans*, verificou-se que no tempo de 5 min, somente a concentração de 100 mg/mL do extrato promoveu redução do biofilme e no tempo de 24 h, as concentrações de 50 e 100 mg/mL apresentaram reduções significativas do biofilme de *P. aeruginosa*. Paula-Ramos et al. (2016) descreveram a ação antimicrobiana de *P. paniculata* em *Klebsiella pneumoniae* (ATCC 4352), onde o extrato apresentou redução da biomassa, viabilidade celular e contra biofilme, na concentração de 200 mg/mL com tempo de tratamento de 5 min, resultados estes que corroboram com este presente estudo.

Os resultados deste estudo demonstram que para o tratamento com extrato de *H. virginiana* (hamamélis) no tempo de 5 min, tanto para o biofilme da associação de *C. albicans* com *S. aureus*, quanto para *S. aureus* com *C. albicans* não apresentaram reduções estatisticamente significativas ($p > 0,05$). No entanto, no biofilme de *C. albicans* com *S. aureus*, no tempo de 24h houve redução de 100% nas concentrações analisadas (100, 50 e 25 mg/mL). O biofilme de *S. mutans* quando associado a *C. albicans* no tempo de 24 h de tratamento, houve significativa redução do biofilme de *S. mutans*. Estes resultados concordam com Gulube e Patel (2016), que avaliaram o efeito da casca da fruta de *Punica granatum* na virulência de *S. mutans*, bem como observaram que o extrato inibiu o crescimento de *S. mutans* em altas concentrações, e as concentrações sub-bactericidas inibiram a formação de biofilme e a produção de polissacarídeos extracelulares, sugerindo que o extrato tem potencial para prevenir a cárie dental.

Analisando o biofilme de *C. albicans* associada com *S. aureus*, observou-se que apenas a concentração de 100 mg/mL, no tempo de 24 h de tratamento, este extrato reduziu as UFC/mL. Para o biofilme de *S. aureus* associado com *C. albicans*, o tratamento no tempo de 5 min, promoveu significativa redução do biofilme ($p > 0,05$), no entanto, no tempo de 24 h, uma redução maior do biofilme de *S. aureus* foi observada na concentração de 100 mg/mL. Resultados semelhantes a este estudo, sobre ação antimicrobiana de *H. virginiana* (hamamélis), também foram descritos no estudo de Gloor et al. (2002) que analisaram o efeito antisséptico da formulação dermatológica tópica que contém destilado de *Hamamelis* e uréia, foi observado que

no teste de difusão em ágar que essa loção inibiu o crescimento de *C. albicans* e *S. aureus* isolados.

Observando o biofilme de *C. albicans* quando associada com *E. faecalis*, o tratamento com extrato de *H. virginiana* (hamamelis) foi estatisticamente significativo no tempo de 24 h, na concentração de 100 mg/mL. No tratamento do biofilme de *E. faecalis* em associação a *C. albicans* no tempo de 5 min, demonstrou redução significativa ($p > 0,05$) nas concentrações de 100 e 50 mg/mL. No tempo de 24 h, *E. faecalis* apresentou redução de 100% na concentração de 25 mg/mL. Resultados semelhantes a este estudo foram observados por Mistry et al. (2015), em que avaliaram a atividade antimicrobiana de *Azadirachta indica* (Neem) e *Mimusops elengi* (Bakul) em biofilme polimicrobiano formados nas paredes de canais radiculares de dentes extraídos, e verificaram que o extracto metanólico de *A. Indica* e *M. elengi* e apresentou considerável atividade antimicrobiana contra *S. mutans*, *E. faecalis*, *S. aureus* e *C. albicans*.

Foi observado, que no tempo de tratamento de 5 min com o mesmo extrato, *C. albicans* quando associada com *P. aeruginosa*, apresentou redução estatisticamente significativas ($p > 0,05$), e no tempo de tratamento de 24 h, redução do biofilme de *C. albicans* foi de 100% para as concentrações de 100 e 50 mg/mL. Para o biofilme de *P. aeruginosa* quando em associação com *C. albicans* no tratamento com *H. virginiana* (hamamélis), no tempo de 24 h, as concentrações de 100 e 50 mg/mL do extrato, apresentaram redução estatisticamente significativas ($p > 0,05$) do biofilme de *P. aeruginosa*. A atividade antimicrobiana sobre esses micro-organismos foi estudada por Voukeng et al. (2017), que avaliaram a ação antimicrobiana de sete extratos da região Africana de Camarões contra micro-organismos Gram-positivos e negativos multirresistentes e observaram que o extrato de *Euphorbia prostrata* apresentou alto potencial aos antimicrobianos para todas as cepas de micro-organismos analisados, entre eles *S. aureus* e *P. aeruginosa*.

Este estudo verificou que o tratamento com extrato de *S. barbatiman* (barbatimão) promoveu redução do biofilme de *C. albicans* (quando associado com *S. mutans*) na concentração de 100 mg/mL no tempo de 24 h. No tempo de 5 min e 24 h, o biofilme *S. mutans* quando associado com *C. albicans* mostrou redução estatisticamente significantes nas concentrações de 100, 50 e 25 mg/mL em UFC/mL. Pereira EM et al. (2011) também avaliaram a atividade antimicrobiana de

extrato de plantas medicinais brasileiras contra micro-organismos de interesse odontológico, e observaram a ação antimicrobiana do extrato butanol, hexano e etanol de *S. adstringens* (espécie semelhante a *S. barbatiman*) em *C. albicans*, *S. aureus* e *S. mutans*.

C. albicans associada com *S. aureus*, apresentou redução significativa no tratamento com extrato de *S. barbatiman* no tempo de 24 h, nas três concentrações analisadas. O biofilme de *S. aureus* associado com *C. albicans*, mostrou redução estatisticamente significantes nas concentrações de 100, 50 e 25 mg/mL, no tempo de tratamento de 5 min e em 24 h a redução foi observada nas concentrações de 100 e 50 mg/mL. Nossos resultados concordam com de Oliveira et al. (2013), que estudaram os efeitos do extrato de *S. barbatiman* e outros extratos de plantas brasileiras em micro-organismos de interesse odontológico, observando que *S. barbatiman* apresentou atividade antimicrobiana contra *Staphylococcus* spp (*S. aureus* e *S. epidermidis*), *S. mutans* e *Candida* spp. (*C. tropicalis*, *C. glabrata* e *C. albicans*).

O biofilme de *C. albicans* quando associada com *E. faecalis*, no tratamento com extrato de *S. barbatiman* (barbatimão), apresentou redução do biofilme apenas no tempo de tratamento de 24 h, na concentração de 100 mg/mL. No entanto, nos tempos de 5 h e 24 h, o tratamento com extrato apresentou redução do biofilme de *E. faecalis* associado a *C. albicans* nas concentrações de 100, 50 e 25 mg/mL. O estudo de Ohikhena et al. (2017) apresentaram resultados semelhantes a este estudo, onde pesquisaram as propriedades antimicrobianas e antifúngicas do extrato de *Phragmanthera capitata*, e concluíram que o extrato de *P. capitata* foi efetivo em sua ação antimicrobiana contra *E. faecalis* e *S. aureus*. A ação antimicrobiana em *P. aeruginosa* foi observada em concentrações mais altas do extrato e o extrato não apresentou ação antifúngica para *C. albicans*.

O tratamento do biofilme de *C. albicans* quando associada com *P. aeruginosa*, mostrou redução de 100% nas três concentrações analisadas no presente estudo, quando tratados com extrato de *S. barbatiman* (barbatiman) no tempo de 5 min. No tempo de tratamento de 24 h, as concentrações de 100, 50 e 25 mg/mL também apresentaram reduções estatisticamente significantes. A ação do extrato no biofilme de *P. aeruginosa* no tempo de 5 min, mostrou redução somente na concentração de 100 mg/mL e no tempo de 24 h, a redução ocorreu nas

concentrações de 100 e 50 mg/mL. Estudos com as características e ação antimicrobiana de *S. barbatiman* (barbatiman) são escassos na literatura, sendo este trabalho um dos pioneiros sobre a ação antimicrobiana em biofilme heterotípico deste extrato.

Na análise do tratamento com o extrato de *G. sylvestre* (gimena), o biofilme de *C. albicans* em associação a *S. mutans*, no tempo de 24 h, apresentou redução de UFC/mL na concentração de 100 mg/mL. Na associação de *S. mutans* em interação com *C. albicans*, no tempo de tratamento de 5 min, a redução do biofilme ocorreu nas concentrações de 50 e 25 mg/mL, e no tempo de 24 h, a redução ocorreu somente na concentração de 100 mg/mL. Resultados semelhantes do biofilme de *C. albicans* foram observados no estudo de VEDIYAPPAN et al. (2013), que constataram que o ácido gimênico não foi efetivo para inibir o crescimento e a viabilidade de *C. albicans*, mas atuou na inibição da transição de levedura para hifa, e como a forma hifal é responsável pela invasão tecidual, o ácido gimênico inibiu a virulência de *C. albicans*.

A ação do extrato de *G. sylvestre* (gimena) sobre biofilme de *C. albicans* em associação com *S. aureus*, no tempo de 5 min, mostrou redução em UFC/mL nas concentrações de 100, 50 e 25 mg/mL. Para o biofilme de *S. aureus* quando associado com *C. albicans*, no tempo de 5 min, a ação do extrato proporcionou redução do crescimento do biofilme nas três concentrações analisadas (100, 50 e 25 mg/mL) e no tempo de 24 h, a redução do biofilme sob ação do extrato foi demonstrada somente na concentração de 100 mg/mL. SATDIVE et al. (2003) verificaram a atividade antimicrobiana pelo teste ágar difusão do extrato etanólico de *G. sylvestre* sobre alguns micro-organismos, entre eles *S. aureus*, resultados estes semelhantes ao observado neste estudo.

Avaliando o tratamento do extrato de *G. sylvestre* (gimena), no biofilme de *C. albicans* em associação com *E. faecalis* no tempo de tratamento de 24 h, demonstrou redução estatisticamente significativa na concentração de 100 mg/mL. Para o biofilme de *E. faecalis* associado a *C. albicans* no tempo de tratamento de 5 min, a ação do extrato na redução de *E. faecalis* foi observada nas concentrações de 100, 50 e 25 mg/mL. No tempo de 24 h de tratamento, a redução de UFC/mL foi descrita nas concentrações de 50 e 25 mg/mL e uma maior ação do extrato na redução do biofilme foi observada na concentração de 100 mg/mL. Como neste

estudo, bactérias bucais também foram analisadas por Süntar et al. (2016) que avaliaram os efeitos do extrato de *Hypericum perforatum* contra bactérias bucais e formadoras de biofilme e relataram que o extrato aquoso de *H. perforatum* foi mais ativa contra todos os patógenos estudados, entre eles *S. mutans*, *S. sobrinus*, *L. plantarum* e *E. faecalis* sugerindo a ação antimicrobiana deste extrato.

Na interação de *C. albicans* associada com *P. aeruginosa*, no tempo de tratamento de 5 min e 24 h, foi observada redução estatisticamente significativa do biofilme de *C. albicans* nas concentrações de 100, 50 e 25 mg/mL. Para o tratamento de *P. aeruginosa* em interação com *C. albicans*, o extrato de *G. sylvestre* (gimena) promoveu a redução do biofilme nas três concentrações analisadas (100, 50 e 25 mg/mL), e no tempo de tratamento de 24 h a redução foi observada somente na concentração de 100 mg/mL. Estes resultados concordam com Arora e Sood (2017), que também verificaram a ação antimicrobiana do extrato de *G. sylvestre* em cepas de *C. albicans*, *S. aureus* e *P. aeruginosa*. Arun et al. (2014) estudaram as propriedades antimicrobianas do ácido gimênico em teste ágar de difusão, e o ácido gimênico mostrou ação antimicrobiana contra alguns micro-organismos, entre eles *S. aureus* e *P. aeruginosa* na concentração de 30 mg/mL.

De acordo com os resultados obtidos, os extratos apresentaram reduções significativas sobre biofilmes heterotípicos, sendo que alguns micro-organismos foram mais sensíveis que outros. Estes resultados trazem contribuições relevantes à literatura médica-odontológica, de modo que poderá contribuir para novos estudos e para o desenvolvimento futuro de medicamentos fitoterápicos de uso médico-odontológico.

6 CONCLUSÃO

Com os resultados obtidos neste estudo, podemos concluir que o tratamento com os extratos de *P. paniculata* (pfaffia), *H. virginiana* (hamamelis), *S. barbatiman* (barbatimão) e *G. sylvestre* (gimena) demonstraram ação antimicrobiana sobre o biofilme multiespécie de *C. albicans* em associação com os micro-organismos analisados nos tempos de 5 min e 24 h. Observamos, que:

No tratamento com extrato de *P. paniculata* (pfaffia), verificamos sua ação antimicrobiana na associação de *C. albicans* com as quatro bactérias no tempo de 24 h de tratamento, e das bactérias quatro bactérias em associação com *C. albicans* no tempo de tratamento de 5 min. A associação de *C. albicans* com *S. aureus* e *C. albicans* com *P. aeruginosa*, no tempo de 5 min, e a associação de *S. mutans* com *C. albicans*, *S. aureus* com *C. albicans* e *P. aeruginosa* com *C. albicans*, em 24 h de tratamento, também observamos a ação antimicrobiana do extrato.

No tratamento com extrato de *H. virginiana* (hamamelis), verificamos que no tempo de 24 h, as associações de *C. albicans* com as quatro bactérias e a associação das quatro bactérias com *C. albicans* sofreram ação antimicrobiana do extrato. No entanto, no tempo de 5 min a associação de *C. albicans* com *S. aureus* e *C. albicans* com *P. aeruginosa*, e a associação de *S. aureus* com *C. albicans* e *E. faecalis* com *C. albicans* apresentaram ação do extrato na redução do biofilme.

No tratamento com extrato de *S. barbatiman* (barbatimão) e com extrato de *G. sylvestre* (gimena), observamos que no tempo de 5 min e 24 h, verificamos a ação do extrato na redução do biofilme nas associações das quatro bactérias quando em associação com *C. albicans*. Quando observamos a associação de *C. albicans* com *S. aureus* e *C. albicans* com *P. aeruginosa*, em 5 min de tratamento, e a associação de *C. albicans* com *S. mutans*, *C. albicans* com *E. faecalis* e *C. albicans* com *P. aeruginosa*, em 24 h de tratamento observamos redução do biofilme pela ação antimicrobiana devido a ação do extrato.

Podemos também afirmar que os extratos utilizados neste trabalho proporcionaram reduções mais significativas dos biofilmes heterotípicos, no tempo de tratamento de 24 h.

REFERÊNCIAS*

- Ali L, Goraya MU, Arafat Y, Ajmal M, Chen JL, Yu D. Molecular mechanism of *quorum-sensing* in *Enterococcus faecalis*: its role in virulence and therapeutic approaches. *Int J Mol Sci*. 2017 May 3;18(5). pii: E960. doi: 10.3390/ijms18050960.
- Arora DS, Sood H. In vitro antimicrobial potential of extracts and phytoconstituents from *Gymnema sylvestre* R.Br. leaves and their biosafety evaluation. *AMB Express*. 2017 Dec;7(1):115. doi: 10.1186/s13568-017-0416-z.
- Arun LB, Arunachalam AM, Arunachalam KD, Annamalai SK, Kumar KA. In vivo anti-ulcer, anti-stress, anti-allergic, and functional properties of gymnemic acid isolated from *Gymnema sylvestre* R Br. *BMC Complement Altern Med*. 2014 Feb 22;14:70. doi: 10.1186/1472-6882-14-70.
- Biaggini K, Borrel V, Szunerits S, Boukherroub R, N'Diaye A, Zébré A, et al. Substance P enhances lactic acid and tyramine production in *Enterococcus faecalis* V583 and promotes its cytotoxic effect on intestinal Caco-2/TC7 cells. *Gut Pathog*. 2017 Apr 21;9:20. doi: 10.1186/s13099-017-0171-3.
- Capolupo A, Esposito R, Zampella A, Festa C, Riccio R, Casapullo A, et al. Determination of *Gymnemic acid* I as a protein biosynthesis inhibitor using chemical proteomics. *J Nat Prod*. 2017 Apr 28;80(4):909-915. doi:10.1021/acs.jnatprod.6b00793.
- Chen G, Guo M. Rapid screening for α -glucosidase inhibitors from *Gymnema sylvestre* by affinity ultrafiltration-HPLC-MS. *Front Pharmacol*. 2017 Apr 27;8:228. doi: 10.3389/fphar.2017.00228.
- Cheng M, Liang J, Zhang Y, Hu L, Gong P, Cai R, et al. The bacteriophage EF-P29 efficiently protects against lethal vancomycin-resistant *Enterococcus faecalis* and alleviates gut microbiota imbalance in a murine bacteremia model. *Front Microbiol*. 2017 May 9;8:837. doi: 10.3389/fmicb.2017.00837.
- 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 Sep;28(1):459-69. doi: 10.1016/j.intimp.2015.07.002.
- Costa MA, Palazzo de Mello JC, Kaneshima EN, Ueda-Nakamura T, Dias Filho BP, Audi EA, et al. Acute and chronic toxicity of an aqueous fraction of the stem bark of *Stryphnodendron adstringens* (barbatimão) in rodents. *Evid Based Complement Alternat Med*. 2013;2013:841580. doi: 10.1155/2013/841580.

*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

da Silva TC, Cogliati B, da Silva AP, Fukumasu H, Akisue G, Nagamine MK, et al. *Pfaffia paniculata* (Brazilian ginseng) roots decrease proliferation and increase apoptosis but do not affect cell communication in murine hepatocarcinogenesis. *Exp Toxicol Pathol*. 2010 Mar;62(2):145-55. doi: 10.1016/j.etp.2009.03.003.

de Oliveira JR, de Castro VC, das Graças Figueiredo Vilela P, Camargo SE, Carvalho CA, Jorge AO, et al. Cytotoxicity of Brazilian plant extracts against oral microorganisms of interest to dentistry. *BMC Complement Altern Med*. 2013 Aug 15;13:208. doi: 10.1186/1472-6882-13-208.

Duckstein SM, Lorenz P, Stintzing FC. Conversion of phenolic constituents in aqueous *Hamamelis virginiana* leaf extracts during fermentation. *Phytochem Anal*. 2012 Nov-Dec;23(6):588-97. doi: 10.1002/pca.2359.

Elisha IL, Botha FS, McGaw LJ, Eloff JN. The antibacterial activity of extracts of nine plant species with good activity against *Escherichia coli* against five other bacteria and cytotoxicity of extracts. *BMC Complement Altern Med*. 2017 Feb 28;17(1):133. doi: 10.1186/s12906-017-1645-z.

Feldman M, Shenderovich J, Lavy E, Friedman M, Steinberg D. A Sustained-Release Membrane of Thiazolidinedione-8: Effect on formation of a *Candida*/bacteria mixed biofilm on hydroxyapatite in a continuous flow model. *Biomed Res Int*. 2017;2017:3510124. doi: 10.1155/2017/3510124.

Gholami S, Tabatabaei M, Sohrabi N. Comparison of biofilm formation and antibiotic resistance pattern of *Pseudomonas aeruginosa* in human and environmental isolates. *Microb Pathog*. 2017 May 23;109:94-98. doi: 10.1016/j.micpath.2017.05.004.

Gloor M, Reichling J, Wasik B, Holzgang HE. Antiseptic effect of a topical dermatological formulation that contains *Hamamelis* distillate and urea. *Forsch Komplementarmed Klass Naturheilkd*. 2002 Jun;9(3):153-9.

Gulube Z, Patel M. Effect of *Punica granatum* on the virulence factors of cariogenic bacteria *Streptococcus mutans*. *Microb Pathog*. 2016 Sep;98:45-9. doi: 10.1016/j.micpath.2016.06.027. doi: 10.1016/j.micpath.2016.06.027

Hagen SJ, Son M. Origins of heterogeneity in *Streptococcus mutans* competence: interpreting an environment-sensitive signaling pathway. *Phys Biol*. 2017 Jan 27;14(1):015001. doi: 10.1088/1478-3975/aa546c.

Hotterbeekx A, Kumar-Singh S, Goossens H, Malhotra-Kumar S. *In vivo* and *in vitro* interactions between *Pseudomonas aeruginosa* and *Staphylococcus* spp. *Front Cell Infect Microbiol*. 2017 Apr 3;7:106. doi: 10.3389/fcimb.2017.00106.

How KY, Song KP, Chan KG. *Porphyromonas gingivalis*: an overview of periodontopathic pathogen below the gum line. *Front Microbiol*. 2016 Feb 9;7:53. doi: 10.3389/fmicb.2016.00053.

Ishida K, Rozental S, de Mello JC, Nakamura CV. Activity of tannins from *Stryphnodendron adstringens* on *Cryptococcus neoformans*: effects on growth, capsule size and pigmentation. *Ann Clin Microbiol Antimicrob*. 2009 Nov 5;8:29. doi: 10.1186/1476-0711-8-29.

Kipre BG, Guessennd NK, Koné MW, Gbonon V, Coulibaly JK, Dosso M. Antibacterial activity of the stem bark of *Tieghemella heckelii* Pierre ex. A Chev against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *BMC Complement Altern Med*. 2017 Mar 27;17(1):170. doi: 10.1186/s12906-017-1681-8.

Kong EF, Tsui C, Kucharíková S, Van Dijck P, Jabra-Rizk MA. Modulation of *Staphylococcus aureus* response to antimicrobials by the *Candida albicans* quorum sensing molecule farnesol. *Antimicrob Agents Chemother*. 2017 Nov 22;61(12). pii: e01573-17. doi: 10.1128/AAC.01573-17.

Krzyściak W, Kościelniak D, Papież M, Vyhouckaya P, Zagórska-Świeży K, Kołodziej I, et al. Effect of a *Lactobacillus Salivarius* probiotic on a double-species *Streptococcus mutans* and *Candida albicans* caries biofilm. *Nutrients*. 2017 Nov 14;9(11). pii: E1242. doi: 10.3390/nu9111242.

Li J, Jadhav AN, Khan IA. Triterpenoids from Brazilian ginseng, *Pfaffia paniculata*. *Planta Med*. 2010 Apr;76(6):635-9. doi: 10.1055/s-0029-1240631.

Liakos IL, Holban AM, Carzino R, Lauciello S, Grumezescu AM. Electrospun fiber pads of cellulose acetate and essential oils with antimicrobial activity. *Nanomaterials* (Basel). 2017 Apr 12;7(4). pii: E84. doi: 10.3390/nano7040084.

Lopes GC, Sanches AC, Nakamura CV, Dias Filho BP, Hernandez L, de Mello JC. Influence of extracts of *Stryphnodendron polyphyllum* Mart. and *Stryphnodendron obovatum* Benth. on the cicatrization of cutaneous wounds in rats. *J Ethnopharmacol*. 2005 Jun 3;99(2):265-72.

Loyola-Rodriguez JP, Garcia-Cortes JO, Martinez-Martinez RE, Patiño-Marin N, Martinez-Castañón GA, Zavala-Alonso NV, et al. Molecular identification and antibiotic resistant bacteria isolated from primary dentition infections. *Aust Dent J*. 2014 Dec;59(4):497-503. doi: 10.1111/adj.12213.

Marwa C, Fikri-Benbrahim K, Ou-Yahia D, Farah A. African peppermint (*Mentha piperita*) from Morocco: Chemical composition and antimicrobial properties of essential oil. *J Adv Pharm Technol Res*. 2017 Jul-Sep;8(3):86-90. doi: 10.4103/japtr.JAPTR_11_17

Mikami Y, Suzuki N, Takahashi T, Otsuka K, Tsuda H. Bacitracin upregulates mbrAB transcription via mbrCD to confer bacitracin resistance in *Streptococcus mutans*. *J Pharmacol Sci*. 2011;117(3):204-7.

Mistry KS, Sanghvi Z, Parmar G, Shah S, Pushpalatha K. Antibacterial efficacy of *Azadirachta indica*, *Mimusops elengi* and 2% CHX on multispecies dentinal biofilm. *J Conserv Dent*. 2015 Nov-Dec;18(6):461-6. doi: 10.4103/0972-0707.168810.

Mouchrek Junior JC, Nunes LH, Arruda CS, Rizzi Cde C, Mouchrek AQ, Tavares RR, et al. Effectiveness of oral antiseptics on tooth biofilm: a study *in vivo*. J Contemp Dent Pract. 2015 Aug 1;16(8):674-8.

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 Jan;61(1):75-82. doi: 10.1016/j.etp.2008.01.017.

Ohikhena FU, Wintola OA, Afolayan AJ. Evaluation of the antibacterial and antifungal properties of *Phragmanthera capitata* (Sprengel) Balle (Loranthaceae), a mistletoe growing on rubber tree, using the dilution techniques. ScientificWorldJournal. 2017;2017:9658598. doi: 10.1155/2017/9658598.

O'Meara TR, Robbins N, Cowen LE. The Hsp90 chaperone network modulates *Candida* virulence traits. Trends Microbiol. 2017 May 23. pii: S0966-842X(17)30113-0. doi: 10.1016/j.tim.2017.05.003.

Ota A, Ulrich NP. An overview of herbal products and secondary metabolites used for management of type two diabetes. Front Pharmacol. 2017 Jul 6;8:436. doi: 10.3389/fphar.2017.00436.

Ozel GS, Guneser MB, Inan O, Eldeniz AU. Evaluation of *C. albicans* and *S. mutans* adherence on different provisional crown materials. J Adv Prosthodont. 2017 Oct;9(5):335-340. doi: 10.4047/jap.2017.9.5.335.

Parker D. Humanized mouse models of *Staphylococcus aureus* infection. Front Immunol. 2017 May 4;8:512. doi: 10.3389/fimmu.2017.00512.

Paula-Ramos L, da Rocha Santos CE, Camargo Reis Mello D, Nishiyama Theodoro L, De Oliveira FE, Back Brito GN, et al. *Klebsiella pneumoniae* planktonic and biofilm reduction by different plant extracts: *in vitro* study. ScientificWorldJournal. 2016;2016:3521413. doi: 10.1155/2016/3521413.

Pereira CA, Costa AC, Carreira CM, Junqueira JC, Jorge AO. Photodynamic inactivation of *Streptococcus mutans* and *Streptococcus sanguinis* biofilms *in vitro*. Lasers Med Sci. 2013 May;28(3):859-64. doi: 10.1007/s10103-012-1175-3.

Pereira EM, Gomes RT, Freire NR, Aguiar EG, Brandão Md, Santos VR. In vitro antimicrobial activity of Brazilian medicinal plant extracts against pathogenic microorganisms of interest to dentistry. Planta Med. 2011 Mar;77(4):401-4. doi: 10.1055/s-0030-1250354. Epub 2010 Sep 22.

Pinello KC, Fonseca Ede S, Akisue G, Silva AP, Salgado Oloris SC, Sakai M, et al. Effects of *Pfaffia paniculata* (Brazilian ginseng) extract on macrophage activity. Life Sci. 2006 Feb 16;78(12):1287-92.

Reicher F, Leitner SCS, Sierakowski MR, Fontana JD, Correa JBC. Seed gum of *Stryphnodendron barbatiman* (barbatimão). Appl Biochem Biotechnol. 1991;28(1):353–61.

Sampaio FC, Pereira Mdo S, Dias CS, Costa VC, Conde NC, Buzalaf MA. In vitro antimicrobial activity of *Caesalpinia ferrea* Martius fruits against oral pathogens. J Ethnopharmacol. 2009 Jul 15;124(2):289-94. doi: 10.1016/j.jep.2009.04.034.

Satdive RK, Abhilash P, Fulzele DP. Antimicrobial activity of *Gymnema sylvestre* leaf extract. Fitoterapia. 2003 Dec;74(7-8):699-701.

Süntar I, Oyadı O, Akkol EK, Özçelik B. Antimicrobial effect of the extracts from *Hypericum perforatum* against oral bacteria and biofilm formation. Pharm Biol. 2016;54(6):1065-70. doi: 10.3109/13880209.2015.1102948. Epub 2015 Oct 29.

Theisen LL, Erdelmeier CA, Spoden GA, Boukhallouk F, Sausy A, Florin L, et al. Tannins from *Hamamelis virginiana* bark extract: characterization and improvement of the antiviral efficacy against influenza A virus and human papillomavirus. PLoS One. 2014 Jan 31;9(1):e88062. doi: 10.1371/journal.pone.0088062.

Tomé FM, Paula Ramos L, Freire F, Pereira CA, de Oliveira ICB, Junqueira JC, et al. Influence of sucrose on growth and sensitivity of *Candida albicans* alone and in combination with *Enterococcus faecalis* and *Streptococcus mutans* to photodynamic therapy. Lasers Med Sci. 2017 Apr 7. doi: 10.1007/s10103-017-2201-2.

Trolezi R, Azanha JM, Paschoal NR, Chechi JL, Dias Silva MJ, Fabris VE, et al. *Stryphnodendron adstringens* and purified tannin on *Pythium insidiosum*: *in vitro* and *in vivo* studies. Ann Clin Microbiol Antimicrob. 2017 Feb 23;16(1):7. doi: 10.1186/s12941-017-0183-3.

Vediyappan G, Dumontet V, Pelissier F, d'Enfert C. Gymnemic acids inhibit hyphal growth and virulence in *Candida albicans*. PLoS One. 2013 Sep 11;8(9):e74189. doi: 10.1371/journal.pone.0074189.

Volpato L, Gabardo MC, Leonardi DP, Tomazinho PH, Maranhão LT, Baratto-Filho F. Effectiveness of *Persea major* Kopp (Lauraceae) extract against *Enterococcus faecalis*: a preliminary in vitro study. BMC Res Notes. 2017 Mar 6;10(1):119. doi: 10.1186/s13104-017-2443-x.

Voukeng IK, Beng VP, Kuete V. Multidrug resistant bacteria are sensitive to *Euphorbia prostrata* and six others Cameroonian medicinal plants extracts. BMC Res Notes. 2017 Jul 25;10(1):321. doi: 10.1186/s13104-017-2665-y.

Yadav P, Chaudhary S, Saxena RK, Talwar S, Yadav S. Evaluation of antimicrobial and antifungal efficacy of chitosan as endodontic irrigant against *Enterococcus faecalis* and *Candida albicans* biofilm formed on tooth substrate. J Clin Exp Dent. 2017 Mar 1;9(3):e361-e367. doi: 10.4317/jced.53210.

Zuñiga LY, González-Ortiz M, Martínez-Abundis E. Effect of *Gymnema sylvestre* administration on metabolic syndrome, insulin sensitivity, and insulin secretion. J Med Food. 2017 May 1. doi: 10.1089/jmf.2017.0001.

ANEXO A – Laudo Técnico do extrato glicólico de *Pfaffia paniculata*



CERTIFICADO DE ANÁLISE EXT. GLIC. PFAFFIA 50 LT

OP: 019544
Fabricação: 14/04/16
Origem: Brasil
Nomenclatura INCI: Pfaffia Paniculata Root Extract
Planta utilizada: Pfaffia paniculata Kuntze

Lote: PROD019544
Validade: 14/04/19
Procedência: Brasil
No CAS: 57-55-6; 64-17-5; 7732-18-5; 2682-20-4*
Parte utilizada: Raiz

Parâmetros	Especificado	Resultados
Densidade (g/cm ³)	Entre 1,000 e 1,100	1,012
Índice de Refração (20°C)	Entre 1,350 e 1,420	1,3769
pH (sol a 10%)	Entre 4,00 e 6,00	5,25
Aparência	Líquido	De acordo
Bolores e Leveduras	Max 100 UFC/ g	< 10
Coliformes Fecais	Ausente	De acordo
Coliformes Totais	Ausente	De acordo
Contagem total	Max. 100 UFC / g	< 10
Cor	Âmbar a castanho amarelado	De acordo
Odor	Característico	De acordo
Solubilidade	Solúvel em propilenoglicol, glicerina e sorbitol. Pode sofrer turvação em água e sofre precipitação em etanol.	Solúvel em água. Ocorre turvação em etanol

Monografia: METODOLOGIA INTERNA

Armazenamento: Acondicionar em recipiente hermético, ao abrigo de calor e de luz solar direta. Com o tempo pode sofrer turvação e/ou precipitação.

OBS: ** Poderá haver alteração de cor por modificação dos componentes coloridos da planta ou de acordo com o lote/safra utilizada.

USO: Externo

OBS: As assinaturas somente serão válidas quando estiverem acompanhadas da nota fiscal

Dr. Luiz Gustavo Martins Matheus
Farmacêutico Bioquímico
CRF - SP: 14.851

Dr. Valdir Martin Caia
Farmacêutico Industrial
CRF- SP 32.352

27/01/17

Departamento técnico

Data de emissão

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

ANEXO B – Laudo Técnico do extrato glicólico de *Hamamelis virginiana*.L
CERTIFICADO DE ANÁLISE
EXT. GLIC. HAMAMELIS 50 LT

OP: 019986 Lote: PROD019986
 Fabricação: 23/11/16 Validade: 23/11/19
 Origem: Brasil Procedência: Brasil
 Nomenclatura INCI: HAMAMELIS VIRGINIANA LEAF EXTRACT No CAS: 84696-19-5
 Planta utilizada: Hamamelis virginiana L. Parte utilizada: Folha

Parâmetros	Especificado	Resultados
Densidade (g/cm3)	Entre 1,000 e 1,100	1,018
pH (sol a 10%)	Entre 2,50 e 4,50	4,00
Aparência	Líquido	De acordo
Bolores e Leveduras	Max 100 UFC/ g	< 10
Coliformes Fecais	Ausente	De acordo
Coliformes Totais	Ausente	De acordo
Contagem total	Max. 100 UFC / g	< 10
Cor	Levemente amarelado a âmbar	De acordo
Odor	Característico	De acordo
Solubilidade	Solúvel em etanol, propilenoglicol, glicerina, sorbitol e água.	De acordo

Monografia: METODOLOGIA INTERNA

Armazenamento: Acondicionar em recipiente hermético, ao abrigo de calor e de luz solar direta. Com o tempo pode sofrer turvação e/ou precipitação.

OBS: ** Poderá haver alteração de cor por modificação dos componentes coloridos da planta ou de acordo com o lote/safra utilizada.

USO: Externo

OBS: As assinaturas somente serão válidas quando estiverem acompanhadas da nota fiscal

Dr. Luiz Gustavo Martins Matheus
 Farmacêutico Bioquímico
 CRF - SP: 14.851

Dr. Valdir Martin Caña
 Farmacêutico Industrial
 CRF - SP 32.352

27/01/17

Departamento técnico

Data de emissão

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

ANEXO C – Laudo Técnico do extrato glicólico de *Gimnema sylvestre*

UNIFARMA FARMÁCIA DE MANIPULAÇÃO LTDA
NFe normal de saída 120961 série 2 em 14/01/2015

**Extrato Glicólico de Gimnema**

Fabricação	Validade	Lote	Procedência
29/10/2014	29/10/2016	ALL 056134	NACIONAL
Categoria			Origem
Insumo Cosmético			BRASIL

Ensaio e Especificações	Resultado	Referência	Laboratório
ARMAZENAMENTO			
Mantenha o produto em local seco e arejado, protegido de umidade e calor.	De acordo	MA 40850	All Chemistry
ASPECTO			
Líquido de média viscosidade.	De acordo	MA 40850	All Chemistry
COR			
Castanho a Castanho escuro.	De acordo	MA 40850	All Chemistry
DENSIDADE (20 °C +/- 4 °C)			
Entre 0,95g/mL e 1,05g/mL.	1,03g/mL	MA 40850	All Chemistry
ODOR			
Característico.	De acordo	MA 40850	All Chemistry
pH (20 °C +/- 4 °C)			
Entre 3 e 7.	4,33	MA 40850	All Chemistry
SOLUBILIDADE			
Solúvel em bases aquosas.	De acordo	MA 40850	All Chemistry

MA 40850 – Metodologia Analítica da All Chemistry. Especificações fornecidas pelo fabricante.

Lote do Fabricante: 02582102914-1

Informações adicionais

- Nome Botânico: *Gymnema sylvestris*.
- Parte utilizada: Caule e Folha.
- Relação Matéria Prima Vegetal: Derivado Vegetal= 20%.
- Processo de Produção: Percolação / Maceração.
- Solvente de Extração: Propilenoglicol USP / Água.
- Pode ocorrer turbidez e precipitação sem alterar as características do produto. Neste caso, homogeneizar o produto antes do uso.
- Poderá haver alterações de cor por se tratar de um produto natural.

Informações importantes:

Manter em recipiente fechado.

Manter em temperatura ambiente.

Certificado de Qualidade All Chemistry Número ALL 056134-1 em 03/11/2014

Fracionamentos: 056134-2

Os itens analisados pelo laboratório de controle de qualidade All Chemistry estão em conformidade com suas respectivas especificações. Os demais ensaios estão de acordo com o certificado de análise do fornecedor ou do fabricante.


Cintia Regina Maestre Paschoal
CRF-SP: 33.229

ANEXO D – Laudo Técnico do extrato glicólico de *Stryphnodendron barbatiman* M



CERTIFICADO DE ANÁLISE EXT. GLIC. BARBATIMAO

OP: 019825

Fabricação: 01/09/16

Origem: Brasil

Nomenclatura INCI: Stryphnodendron Adstringens Bark Extract

Planta utilizada: Stryphnodendron barbatiman M.

Lote: PROD019825

Validade: 01/09/19

Procedência: Brasil

No CAS: 57-55-6; 64-17-5; *

Parte utilizada: Casca

Parâmetros	Especificado	Resultados
Densidade (g/cm3)	Entre 1,000 e 1,100	1,017
pH (sol a 10%)	Entre 4,00 e 6,00	4,85
Aparência	Líquido	De acordo
Bolores e Leveduras	Max 100 UFC/ g	< 10
Coliformes Fecais	Ausente	De acordo
Coliformes Totais	Ausente	De acordo
Contagem total	Max. 100 UFC / g	< 10
Cor	Castanho a castanho escuro	De acordo
Odor	Característico	De acordo
Solubilidade	Solúvel em propilenoglicol, glicerina, sorbitol, etanol e água. Ocorre leve turvação em etanol.	De acordo

Monografia: FB 5º ED / MICROBIOLOGIA METODOLOGIA 3M

Armazenamento: Acondicionar em recipiente hermético, ao abrigo de calor e de luz solar direta. Com o tempo pode sofrer turvação e/ou precipitação.

OBS: ** Poderá haver alteração de cor por modificação dos componentes coloridos da planta ou de acordo com o lote/safra utilizada.

USO: Externo

OBS: As assinaturas somente serão válidas quando estiverem acompanhadas da nota fiscal

Dr. Luiz Gustavo Martins Matheus
Farmacêutico Bioquímico
CRF - SP: 14.851

Dr. Valdir Martin Caña
Farmacêutico Industrial
CRF- SP 32.352

27/01/17

Departamento técnico

Data de emissão

Av. Dr. Gentil de Moura, 194 CEP - 04278 060 Ipiranga São Paulo SP Tel/Fax 55(11) 5061.5282
mapric@mapric.com.br www.mapric.com.br