



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

VANESSA MARQUES MECCATTI

**AÇÃO ANTIMICROBIANA E ANTIBIOFILME DOS EXTRATOS
COMBINADOS DE CANELA E PRÓPOLIS SOBRE CEPAS CLÍNICAS
DE *Acinetobacter baumannii* e *Pseudomonas aeruginosa*
MULTIRRESISTENTES**

2023

VANESSA MARQUES MECCATTI

**AÇÃO ANTIMICROBIANA E ANTIBIOFILME DOS EXTRATOS COMBINADOS
DE CANELA E PRÓPOLIS SOBRE CEPAS CLÍNICAS DE *Acinetobacter
baumannii* e *Pseudomonas aeruginosa* MULTIRRESISTENTES**

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 CIÊNCIAS APLICADAS À SAÚDE BUCAL.

Área: Microbiologia e Imunologia. Linha de pesquisa: Agentes antimicrobianos e métodos de controle para infecções de interesse médico-odontológico.

Orientadora: Profa. Assoc. Luciane Dias de Oliveira

São José dos Campos

2023

Instituto de Ciência e Tecnologia [internet]. Normalização de tese e dissertação [acesso em 2023]. 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).

Meccatti, Vanessa Marques

Ação antimicrobiana e antibiofilme dos extratos combinados de canela e própolis sobre cepas clínicas de *Acinetobacter baumannii* e *Pseudomonas aeruginosa* multirresistentes / Vanessa Marques Meccatti. - São José dos Campos : [s.n.], 2023.
58 f. : il.

Tese (Doutorado em Ciências Aplicadas à Saúde Bucal) - Pós-Graduação em Ciências Aplicadas à Saúde Bucal - Universidade Estadual Paulista (Unesp), Instituto de Ciência e Tecnologia, São José dos Campos, 2023.
Orientadora: Luciane Dias De Oliveira.

1. Cinnamomum. 2. Propolis. 3. *Pseudomonas aeruginosa*. 4. *Acinetobacter baumannii*. 5. Biofilmes. I. De 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.

IMPACTO POTENCIAL DESTA PESQUISA

O presente trabalho possui impacto científico de relevância visto que as infecções causadas por microrganismos multirresistentes são um desafio mundial. O presente estudo atende o apelo da Organização Mundial da Saúde (OMS) que solicita urgência na descoberta de antimicrobianos contra *Acinetobacter baumannii* e *Pseudomonas aeruginosa*, que são microrganismos de prioridade crítica da OMS. Possui impacto social e econômico, uma vez que a proposta é o estudo de substâncias de origem vegetal e projeta-se que a formulação de um futuro produto antimicrobiano à base de extratos vegetais possuirá custos reduzidos. É inovador, pois poucos são os trabalhos publicados sobre fitoterapia em odontologia e, portanto, o objetivo é expandir este campo de pesquisa na área odontológica. O impacto cultural também é expressivo, visto que são estudados produtos de origem vegetal sendo a própolis verde brasileira, um produto apícola derivado de uma árvore nativa do Brasil (*Baccharis dracunculifolia*). O fato de trazer à luz da ciência uma prática antiga dos povos originários do Brasil também possui grande relevância cultural.

POTENTIAL IMPACT OF THIS RESEARCH

The present work has a relevant scientific impact since infections caused by multiresistant microorganisms are a worldwide challenge. The present study responds to the appeal of the World Health Organization (WHO) that calls for urgency in the discovery of antimicrobials against *Acinetobacter baumannii* and *Pseudomonas aeruginosa*, which are critical microorganisms priority by the WHO. It has a social and economic impact, since the proposal is to study substances of plant origin and it is projected that the formulation of a future antimicrobial product based on plant extracts will have reduced costs. It is innovative, as there are few works published on phytotherapy in dentistry and, therefore, the objective is expand this field of research in the field of dentistry. The cultural impact is also expressive, since products of plant origin are studied, with Brazilian green propolis, a bee product derived from a tree native to Brazil (*Baccharis dracunculifolia*). The fact of bringing to the light of science an ancient practice of the native peoples of Brazil also has great cultural relevance.

BANCA EXAMINADORA

Profa. Assoc. Luciane Dias de Oliveira (Orientadora)

Universidade Estadual Paulista (Unesp)

Instituto de Ciência e Tecnologia

Campus de São José dos Campos

Profa. Dra. Adeline Lacerda Jorjão

Universidade Anhanguera de São Paulo (UNIAN)

Campus de São Paulo

Prof. Dr. Lucas de Paula Ramos

Instituto Taubaté de Ensino Superior (ITES)

Campus de Taubaté

Profa. Dra. Marcela Moreira Penteado

Faculdade Santo Antônio

Campus de Caçapava

Prof. Dr. Rodrigo Máximo de Araújo

Universidade Estadual Paulista (Unesp)

Instituto de Ciência e Tecnologia

Campus de São José dos Campos

São José dos Campos, 08 de maio de 2023.

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais **Fernando José Meccatti e Marli Marques de Souza Meccatti** (in memoriam) que fizeram o possível e o impossível para que eu e minha irmã conquistássemos nossos sonhos.

Ao meu sogro **Paulo Roberto Moraes Domiciano** e minha sogra **Rosely Lopes Rodrigues Domiciano** que são tão prestativos e atenciosos conosco.

Ao meu noivo **Fábio Rodrigues Domiciano** que se revela diariamente a pessoa mais extraordinária que já conheci, pois seu esforço para nossa evolução é constante.

À minha querida orientadora, Profa. Assoc. **Luciane Dias de Oliveira**. Você é uma pessoa incrível que consegue lançar um olhar sensível para cada aluno. Você enxergou meus potenciais e me ajudou a transformar minhas dificuldades. Obrigada por tudo profa!

À profa. **Luana Marotta Reis de Vasconcellos** que compôs minha banca de qualificação e contribui constantemente para minha evolução. Profa. Luana, te admiro tanto como docente, sua atuação em sala de aula é demais.

Ao prof. **Amjad Abu Hasna** pois cada artigo que fizemos parceria produziu muito mais do que currículo: resultou na minha evolução como pesquisadora. Muito obrigada pela paciência e também pela sua contribuição na minha qualificação.

Ao prof. **Lucas de Paula Ramos** que sempre esteve tão presente no dia a dia do laboratório, nos aconselhando com tamanha paciência. Lu, muito obrigada por compor minha banca neste momento tão especial. Te desejo todo sucesso!

Ao prof. **Rodrigo Máximo de Araújo** que de maneira tão entusiasmada, apresenta aos seus alunos inúmeras possibilidades para o nosso crescimento. Muito obrigada prof. por me incentivar e me encorajar na docência, na clínica, no empreendedorismo e na vida!

À profa. **Adeline Lacerda Jorjão** que sempre foi tão educada a cada convite para compor minha banca e tão receptiva para contribuir com nosso trabalho. Muito obrigada!

À profa **Marcela Moreira Penteado** que conduz e corrige os alunos com assertividade e docilidade. Muito obrigada pela sua contribuição durante minha graduação e na finalização do meu Doutorado.

As minhas queridas amigas de laboratório **Raquel Teles de Menezes e Thais Cristine Pereira**. Nossa parceria foi tão leve e divertida, vocês são demais! Obrigada por tudo meninas.

RESUMO

Meccatti VM. Ação antimicrobiana e antibiofilme dos extratos combinados de canela e própolis sobre cepas clínicas de *Acinetobacter baumannii* e *Pseudomonas aeruginosa* multirresistentes [tese]. São José dos Campos (SP): Universidade Estadual Paulista (Unesp), Instituto de Ciência e Tecnologia; 2023.

Os microrganismos resistentes a diferentes classes de agentes antimicrobianos têm se tornado cada vez mais comuns e atualmente são denominados como multirresistentes. Nos hospitais, tais microrganismos apresentam maior perigo, pois são causadores de infecções nosocomiais e a higienização bucal deficiente dos pacientes internados pode tornar a cavidade bucal um sítio para proliferação desses microrganismos multirresistentes. Diante do exposto, novos compostos com ação antimicrobiana precisam ser estudados. O objetivo deste estudo foi avaliar quimicamente o extrato hidroalcolólico de própolis verde de *Baccharis dracunculifolia* e de *Cinnamomum verum* (canela) que foram obtidos a partir da extração da matéria-prima, analisar a atividade antimicrobiana e antibiofilme dos extratos isolados e combinados contra quatro cepas clínicas multirresistentes de *Pseudomonas aeruginosa* e *Acinetobacter baumannii* e verificar a citotoxicidade dos produtos vegetais *in vitro* em linhagem celular de queratinócitos humanos (HaCat). Para tanto, os extratos vegetais foram preparados a partir da matéria-prima da canela em casca e da própolis bruta. Em seguida, foram caracterizados quimicamente por cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC-DAD) para identificação dos principais compostos e a análise do teor de sólidos solúveis dos extratos vegetais também foi realizada. Para avaliação antimicrobiana, foram realizados o teste de microdiluição em caldo de acordo com a *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI) e a análise de *Checkerboard*, para avaliar o efeito combinado dos extratos. A atividade antibiofilme dos extratos combinados foi realizada por meio do teste de MTT, no qual diferentes tempos de contato (5 e 30 min) e diferentes modalidades (inibição na formação do biofilme bacteriano e erradicação do biofilme bacteriano já formado) foram testadas. Para ação citotóxica, as células foram cultivadas em meio DMEM e semeadas na placa de 96 poços. Após aderência inicial, aplicou-se os extratos em diferentes concentrações baseadas nas análises microbiológicas para avaliação da viabilidade celular por meio do teste de MTT. Os dados foram analisados por ANOVA e teste de Tukey, ou Kruskal-Wallis e Dunn, considerando um nível de significância de 5%. Os compostos identificados no extrato de própolis verde de *B. dracunculifolia* foram ácido clorogênico, derivado do ácido cinâmico e apigenina. O aldeído cinâmico foi o principal composto identificado no extrato de *C. verum*. Os extratos vegetais apresentaram ação bactericida sobre todas as cepas analisadas e, quando combinados, os extratos atuaram de modo aditivo e algumas combinações sinérgicas foram encontradas. O protocolo de inibição da formação do biofilme promoveu percentuais de redução superiores quando comparado ao protocolo de erradicação. Valores expressivos de 83,86% ($p < 0,05$) de inibição da formação de biofilme de uma cepa clínica de *A. baumannii* e 89,31% ($p < 0,05$) de inibição em uma cepa clínica de *P. aeruginosa* foram encontrados com a aplicação dos extratos combinados. A atuação dos produtos vegetais foi estatisticamente semelhante a atuação da

clorexidina 0,12%. Em conclusão, os extratos de própolis verde e canela na forma isolada ou combinada apresentaram ação antimicrobiana e antibiofilme sobre cepas clínicas de *A. baumannii* e *P. aeruginosa* multirresistentes. Dessa forma, os produtos vegetais são promissores agentes antissépticos para futuras formulações odontológicas.

Palavras-chave: *Cinnamomum*; propolis; *Pseudomonas aeruginosa*; *Acinetobacter baumannii*; biofilmes.

ABSTRACT

Meccatti VM. Antimicrobial and antibiofilm action of combined extracts of cinnamon and propolis on multiresistant clinical strains of Acinetobacter baumannii and Pseudomonas aeruginosa [doctorate thesis]. São José dos Campos (SP): São Paulo State University (Unesp), Institute of Science and Technology; 2023.

Microorganisms resistant to different classes of antimicrobial agents have become increasingly common and are currently called multidrug resistant. In hospitals, such microorganisms are more dangerous, as they cause nosocomial infections and poor oral hygiene in hospitalized patients can make the oral cavity a site for the proliferation of these multiresistant microorganisms. Given the above, new compounds with antimicrobial action need to be studied. The objective of this study was to chemically evaluate the hydroalcoholic extract of green propolis from Baccharis dracunculifolia and Cinnamomum verum (cinnamon) that were obtained from the extraction of the raw material, to analyze the antimicrobial and antibiofilm activity of the isolated and combined extracts against four clinical strains multiresistant strains of Pseudomonas aeruginosa and Acinetobacter baumannii and verify the cytotoxicity of plant products in vitro in human keratinocyte cell lineage (HaCat). For this purpose, plant extracts were prepared from raw cinnamon bark and raw propolis. Then, they were chemically characterized by high performance liquid chromatography (HPLC-DAD) to identify the main compounds and the analysis of the soluble solids content of the plant extracts was also performed. For antimicrobial evaluation, the broth microdilution test according to the Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) and the Checkerboard analysis were performed to evaluate the combined effect of the extracts. The antibiofilm activity of the combined extracts was performed using the MTT test, in which different contact times (5 and 30 min) and different modalities (inhibition of bacterial biofilm formation and eradication of already formed bacterial biofilms) were tested. For cytotoxic action, cells were cultured in DMEM medium and seeded in the 96-well plate. After initial adhesion, the extracts were applied at different concentrations based on microbiological analyzes to assess cell viability through the MTT test. Data were analyzed by ANOVA and Tukey's test, or Kruskal-Wallis and Dunn, considering a significance level of 5%. The compounds identified in the green propolis extract of B. dracunculifolia were chlorogenic acid, cinnamic acid derivative and apigenin. Cinnamic aldehyde was the main compound identified in the C. verum extract. The plant extracts showed bactericidal action on all strains analyzed and, when combined, the extracts acted additively and some synergistic combinations were found. The biofilm formation inhibition protocol promoted higher reduction percentages when compared to the eradication protocol. Significant values of 83.86% ($p < 0.05$) inhibition of biofilm formation in a clinical strain of A. baumannii and 89.31% ($p < 0.05$) inhibition in a clinical strain of P. aeruginosa were found with the application of the combined extracts. The performance of plant products was statistically similar to the performance of 0.12% chlorhexidine. In conclusion, extracts of green propolis and cinnamon, in isolated or combined form, showed antimicrobial and antibiofilm action on multiresistant clinical strains of A. baumannii and P. aeruginosa. Thus, plant products are promising antiseptic agents for future dental formulations.

Keywords: Cinnamomum; propolis; Pseudomonas aeruginosa; Acinetobacter baumannii; biofilms.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	10
2 REVISÃO DE LITERATURA.....	13
2.1 Bactérias multirresistentes: uma ameaça global	13
2.2 Fitoterapia como alternativa promissora contra infecções	16
3 PROPOSIÇÃO	18
4 MATERIAL E MÉTODOS.....	19
4.1 Extratos	19
4.1.1 Avaliação da composição fitoquímica por HPLC	20
4.1.2 Teor de Sólidos Solúveis	20
4.2 Bactérias	21
4.3 Atividade antimicrobiana dos extratos.....	23
4.3.1 Determinação da CIM e CMM dos extratos vegetais	23
4.3.2 Método de microdiluição <i>Checkerboard</i> das associações	24
4.3.3 Análise da ação antibiofilme dos extratos vegetais	25
4.3.3.1 Avaliação da inibição na formação do biofilme bacteriano (IFBB)	26
4.3.3.2 Avaliação na erradicação do biofilme bacteriano formado (EBBF) ...	27
4.4 Etapa das análises celulares <i>in vitro</i>	27
4.4.1 Cultivo, manutenção e contagem celular	27
4.4.2 Avaliação da citotoxicidade dos extratos vegetais	28
4.5 Análise estatística	29
5 RESULTADO	30
5.1 Avaliação da composição fitoquímica por HPLC	30
5.2 Extratos vegetais: teor de sólidos solúveis / Resíduo seco.....	32
5.3 Determinação da CIM e CMM dos extratos isolados.....	31
5.4 Efeito das combinações dos extratos vegetais	32
5.4.1 Sobre <i>Acinetobacter baumannii</i>	32
5.4.2 Sobre <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	33

5.5 Atividade antibiofilme dos extratos vegetais.....	35
5.5.1 Sobre <i>Acinetobacter baumannii</i>.....	36
5.5.2 Sobre <i>Pseudomonas aeruginosa</i>.....	40
5.5 Citotoxicidade dos extratos vegetais	44
6 DISCUSSÃO	46
7 CONCLUSÃO	52
REFERÊNCIAS.....	53

1 INTRODUÇÃO

As infecções causadas por bactérias multirresistentes (MDR do inglês *Multidrug-resistant*) é reconhecida como uma urgente ameaça de saúde pública. Até 2050, estima-se que 10 milhões de pessoas morrerão anualmente devido a infecções causadas por MDR. Em 2019, o cenário se agravou com o surgimento de uma nova cepa do coronavírus em Wuhan, na China. A doença provocada por este novo coronavírus (SARS-CoV-2) foi denominada COVID-19 e caracteriza-se por uma infecção respiratória aguda. Sabe-se que o novo coronavírus é dotado de “estratégias” para desregular os mecanismos imunológicos, portanto, há um aumento do risco de coinfeção por microrganismos oportunistas, principalmente em pacientes hospitalizados (Riad et al., 2021). Durante a pandemia de COVID-19, a superlotação dos hospitais em todo o mundo e a escassez de leitos e equipamentos de proteção individual (EPI) também foram facilitadores para o rápido crescimento de bactérias multirresistentes. Além disso, as razões para a alta taxa de infecção por MDR podem ser atribuídas pelo uso de antimicrobianos em pacientes com COVID-19 (Hu et al., 2023) e o uso de ventilação mecânica foi fator agravante para desenvolvimento de infecções secundárias do trato respiratório de pacientes com COVID-19 (sendo estimado 1/3 dessas infecções causadas por MDR) (Ceballos et al., 2022).

O gênero *Acinetobacter* é constituído por bactérias coco-bacilos, Gram-negativas, não flageladas, aeróbios estritos e comumente isolada do meio ambiente (Whiteway et al., 2022). A rápida evolução de *Acinetobacter baumannii* como um patógeno nosocomial surpreendeu o mundo e atualmente é considerado importante ameaça para o sistema de saúde pois tem apresentado alta incidência e resistência aos antimicrobianos (Mea et al., 2021). As infecções causadas por *A. baumannii* acometem principalmente pacientes internados em unidade de terapia intensiva (UTI). Dentre as infecções causadas por essa bactéria, pode-se citar: infecções de pele e tecidos moles, endocardite, meningite, infecções do trato urinário e pneumonia (AL-Kadmy et al., 2017), sendo esta última a infecção nosocomial mais comum associada ao *A. baumannii*, com maior incidência em pacientes que necessitam de ventilação mecânica. A taxa de mortalidade por pneumonia associada à ventilação causada por *A. baumannii* varia de 40 a 70% (Ibrahim et al., 2021).

Pseudomonas aeruginosa é um bacilo, Gram-negativo e aeróbio, sendo um patógeno oportunista recorrente em unidades de terapia intensiva (UTI) e um dos principais responsáveis por infecções hospitalares. *P. aeruginosa* é a principal causa de pneumonia associada à ventilação mecânica e é a terceira causa mais comum de infecções do trato urinário relacionadas ao cateter em centros de cuidado intensivo nos Estados Unidos (Weiner-Lastinger et al., 2020). *P. aeruginosa* resistente a carbapenem também está listado na categoria “crítica” de patógenos bacterianos da OMS. As infecções causadas por essa bactéria estão associadas a alta morbidade e mortalidade (Jurado-Martín et al., 2021).

A pneumonia por aspiração ou pneumonia aspirativa é uma infecção pulmonar decorrente da entrada anormal de fluido e secreções orofaríngeas nas vias aéreas inferiores, conduzindo a lesão pulmonar e a infecção. O biofilme dentário acumulado pode ser fonte de bactérias orais que se desprendem e ficam nas secreções salivares que são então aspiradas para o trato respiratório inferior causando pneumonia. Diversos estudos estabeleceram uma ligação significativa entre microrganismos orais, biofilme dentário, doenças bucais e doenças respiratórias. A microbiota oral é conhecida como a principal fonte do microbioma pulmonar e portanto, o biofilme oral pode ser uma fonte de patógenos respiratórios (Bassis et al., 2015; Dong et al., 2022; Pragman et al., 2018).

Para higienização oral dos pacientes internados, a limpeza mecânica com gaze associado a aplicação de enxaguatórios bucais antissépticos, como digluconato de clorexidina, tem sido o protocolo padrão nas unidades de cuidados intensivos, contudo a clorexidina pode causar manchas nos dentes, alteração do paladar e irritação da mucosa bucal (Moshrefi, 2002). O desenvolvimento de novas substâncias que sejam tão eficazes quanto a clorexidina e que apresentem maior biocompatibilidade é necessário para contornar com segurança tais dificuldades e efeitos adversos.

Cronologicamente há um aumento exponencial nos estudos relacionados a terapias alternativas contra infecções causadas por bactérias multirresistentes (Brackman et al., 2011; El-Guendouz et al., 2018; Santos et al., 2020). Os produtos vegetais disparam nas pesquisas pois sabe-se que as plantas são uma fonte rica de estruturas químicas que possuem diversas ações biológicas. É conhecido que, de maneira natural, as plantas geram metabólitos secundários para defesa própria contra

os desafios ambientais, o que resulta em diversas moléculas com mecanismos antibacterianos comparáveis aos antibióticos tradicionais (Doyle, Stephens, 2019).

A canela é obtida da casca interna de várias árvores do gênero *Cinnamomum* e possui uma grande variedade de metabólitos secundários que exibem propriedades antibacterianas, como o cinamaldeído ou ácido cinâmico. Em uma revisão sobre os mecanismos de ação antibacteriano dos componentes da canela, foi relatado que o extrato do produto vegetal pode inibir a divisão celular, inibir porinas de membrana e inibir a motilidade e a formação de biofilme de diversas bactérias, entre elas *Pseudomonas* spp. (Vasconcelos et al., 2018). Também foi relatado que os compostos químicos da canela foram capazes de interferir no sistema quorum sensing de *P. aeruginosa* (Brackman et al., 2011).

A própolis é uma substância produzida pelas abelhas com objetivo de prevenir a colméia de infecções microbianas e suas propriedades biológicas são relatadas há tempos por povos tradicionais como romanos e gregos. Mais de 300 compostos já foram identificados na própolis como compostos fenólicos, ácidos aromáticos e aminoácidos (Anjum et al., 2019). O extrato da própolis marroquina reduziu significativamente o potencial de virulência de cepas clínicas de *S. aureus* resistente a metilicina (MRSA) sem levar ao desenvolvimento de resistência após períodos longos de exposição contínua ao extrato. Também foi capaz de prejudicar a formação do biofilme bacteriano (El-Guendouz et al., 2018).

Tais estudos supracitados encorajam o desenvolvimento de pesquisas sobre as propriedades antimicrobianas dos extratos de canela e própolis sobre cepas bacterianas multirresistentes. Não foram encontrados na literatura consultada análises da combinação de canela e própolis sobre cepas clínicas de *A. baumannii* e *P. aeruginosa* resistentes a antibióticos.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Bactérias multirresistentes: uma ameaça global

Bactérias multirresistentes (MDR) representam uma ameaça crítica para a saúde global, piorando prognósticos e aumentando a mortalidade entre os pacientes infectados. Procedimentos médicos e tratamentos imunossupressores serão de alto risco se a eficácia dos antibióticos continuarem diminuindo ano após ano. O cenário se agravou com pandemia de COVID-19. Mais de 70% dos pacientes com COVID-19 receberam tratamento antimicrobiano, apesar de menos de 10% apresentarem coinfeções bacterianas ou fúngicas (Hu et al., 2023).

Biofilme microbiano é uma comunidade constituída por células e por uma matriz polimérica extracelular, com uma arquitetura que se assemelha a andaimes para envolver os microrganismos juntos e em camadas. Seguindo com o desenvolvimento da comunidade, após adesão inicial, as micro colônias começam a se organizar em uma estrutura com canais de água intermediários (Sharma et al., 2014; Thi et al., 2020). O resultado de toda essa complexa organização é a maior proteção contra estresses ambientais. Tais células bacterianas organizadas em biofilme tornam-se dezenas de vezes mais resistentes aos antibióticos quando comparado a qualquer célula dispersa no meio. Então, o biofilme microbiano consolida-se a partir das etapas de adesão, maturação e dispersão, resultando em uma forma de proteção (Kostakioti et al., 2013; Thi et al., 2020).

Os microrganismos nosocomiais mais comuns como *Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus* apresentam “ferramentas” específicas que induzem a infecção, como por exemplo, algumas toxinas ou determinantes moleculares. Porém quando avaliado o arsenal de fatores de virulência de *A. baumannii*, concluiu-se que a patogênese deste microrganismo pode ser atribuída a uma combinação de elementos trabalhando em conjunto para causar infecção. Dentre eles estão pili (motilidade), porinas, proteínas associadas ao biofilme que fazem adesão e desenvolvimento do biofilme, lipopolissacarídeo (LPS) e proteína de ligação ao

plasminogênio que faz evasão do sistema imune e supressão do sistema complemento (Mea et al., 2021).

Adicionalmente aos fatores citados, a capacidade de formar biofilme, de resistir aos antibióticos e aos métodos de desinfecção destacam *A. baumannii* resistente a carbapenem como patógeno crítico listado no documento “agentes patogênicos prioritários” que consiste em um catálogo publicado em 2017 pela Organização Mundial da Saúde (OMS) com 12 famílias de bactérias que representam a maior ameaça para a saúde humana. *A. baumannii* foi categorizado como “prioridade crítica” o que significa que a pesquisa e o desenvolvimento de novos antibióticos são urgentemente necessários (WHO, 2017).

A capacidade de formação de biofilme de *A. baumannii* aumenta substancialmente sua sobrevivência e persistência, sendo encontrado em diversos dispositivos médicos, como cateteres e tubos endotraqueais (Greene et al., 2016). No estudo de Chapartegui-González et al. (2018) constatou-se que apesar da dessecação e ausência de nutrientes durante 60 dias, cinco cepas clínicas de *A. baumannii* foram capazes de manter a virulência em superfícies abióticas como plástico, vidro e até jalecos embora com capacidade de cultura diminuída.

P. aeruginosa é uma bactéria formadora de biofilme muito conhecida, citado como microrganismo modelo para estudar biofilmes de Gram-negativos (Sharma et al., 2014). O sistema de comunicação que os microrganismos usam dentro do biofilme chama-se Quorum sensing, que consiste em um complexo de sinalizações intercelulares no qual as bactérias se comunicam, resultando na regulação de vários processos e orquestrando o comportamento coletivo das células. *P. aeruginosa* é capaz de utilizar este sistema com excelência para regular a transcrição gênica em resposta à densidade celular resultando na coordenação populacional da comunidade.

Dentre os mecanismos de resistência da *P. aeruginosa* aos carbapenêmicos, pode-se citar a bomba de efluxo. São proteínas transmembrana com a capacidade de transportar moléculas para o exterior das células, resultando na expulsão do fármaco e na resistência à maioria dos medicamentos beta-lactâmicos (Livermore, 2002). Outros mecanismos que podem ser citados são a superprodução da beta-lactamase AmpC, a inativação da proteína da membrana externa e a capacidade de formação de biofilme (Tenover et al., 2022). Portanto, os principais determinantes de virulência

das infecções por *P. aeruginosa* não são apenas fatores ligados a estrutura da superfície celular, mas são também processos ativos como a bomba de efluxo, formação de biofilme e sinalização (*Quorum sensing*) (Sharma et al., 2014; Thi et al., 2020). A lise celular de *P. aeruginosa* causada por estresse ambiental, como por exemplo o uso de um antimicrobiano, libera DNA no ambiente, e esse DNA extracelular (eDNA) é um dos constituintes dos biofilmes de *P. aeruginosa*. O eDNA está envolvido alguns processos importantes para manutenção do biofilme: como fonte de nutrientes para bactérias e auxílio na organização celular. Ainda, a deposição de eDNA torna o ambiente do biofilme ácido, limitando a penetração de agentes antimicrobianos além de influenciar o processo inflamatório ativado por neutrófilos (Thi et al., 2020).

As infecções respiratórias, como a pneumonia envolvem a aspiração de bactérias da orofaringe para o trato respiratório inferior. Sabe-se que a placa dentária pode servir como um reservatório para patógenos respiratórios, especialmente em pacientes de alto risco com má higiene bucal. A pneumonia por aspiração se desenvolve quando o conteúdo gástrico regurgitado ou secreções orofaríngeas, muitas vezes misturados com alimentos e líquidos, são direcionados incorretamente para o sistema respiratório. Em um estudo no qual os indivíduos foram avaliados quanto a colonização da placa dental, mais de 64% dos indivíduos foram detectados com potenciais patógenos respiratórios em amostras de biofilme oral. A prevalência de *P. aeruginosa* foi de 18,1% dos isolados. Simples protocolos de higiene oral dos pacientes internados que necessitam de cuidados especiais podem prevenir a pneumonia por aspiração (Sumi et al., 2007). Em um ensaio clínico randomizado, o qual teve por objetivo avaliar a eficácia da intervenção odontológica na prevenção de infecções nosocomiais do trato respiratório de pacientes hospitalizados, verificou-se que a higiene bucal adequada evitou até 56% das infecções respiratórias (Bellissimo-Rodrigues et al., 2014).

No Brasil, apenas em 2019 foi criado o projeto de lei 883/19 que exige a presença do Cirurgião-Dentista nas UTIs. O hospital universitário de Campo Grande (MS) implantou os serviços odontológicos na UTI em 2015 e, desde então, conseguiu reduzir em 75% as pneumonias associadas à ventilação mecânica (CFO, 2021). O desenvolvimento de novas substâncias que apresentem maior biocompatibilidade para efetivar protocolos de higienização bucal dos pacientes internados é urgente. A

busca por novos compostos segue naturalmente para estudos relacionados a ação biológica de produtos vegetais contra infecções resistentes.

2.2 Fitoterapia como alternativa promissora contra infecções

A canela (*Cinnamomum* spp., família Lauraceae) é uma especiaria obtida da casca de mais de 250 árvores do gênero *Cinnamomum* e são encontradas principalmente na Ásia, China e Austrália. Na culinária tem ampla aplicação tanto em alimentos doces como salgados. A canela obtida a partir da espécie *Cinnamomum verum* é frequentemente considerado como "canela verdadeira" (Jayaprakasha, Rao, 2011). Quimicamente, os principais componentes dos óleos essenciais e extratos de canela são cinamaldeído, eugenol, fenol e linalol (Yanakiev, 2020). Suas propriedades anti-inflamatórias, cardioprotetoras, antioxidantes e antimicrobianas também são relatadas na literatura (Kawatra, Rajagopalan, 2015). Os efeitos antimicrobianos da canela foram citados contra diversos microrganismos orais como *Streptococcus mutans* e *Lactobacillus acidophilus* (Elgamily et al., 2019), *Candida albicans*, *Candida tropicalis* e *Candida krusei* (De Lucena Rangel et al., 2018), *Enterococcus faecalis* (Panchal et al., 2020), *Porphyromonas gingivalis*, *Tannerella forsythia*, *Treponema denticola* e *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* (Saquib et al., 2019) e ainda pode ser benéfica no tratamento da halitose pois reduziu a formação de biofilme de *Solobacterium moorei* (LeBel et al., 2017).

A própolis é um produto apícola resultante da coleta das abelhas de diferentes resinas de plantas e que é misturado com cera e outras substâncias corporais para ser utilizado na construção, adaptação e higiene de seus ninhos. Caracteriza-se por ser um produto pegajoso, de cor escura e cheiro forte (Moise, Bobiş, 2020). Dentre a vasta composição química da própolis, são citados os derivados do ácido cinâmico, como ácido p-cumárico, ácidos benzóicos, ácidos fenólicos, flavonoides e aminoácidos (Hata et al., 2012). A diversidade de composição química confere à própolis uma vantagem adicional como agente antibacteriano, pois essa combinação de muitos ingredientes ativos em várias proporções funciona como um obstáculo para o processo da resistência bacteriana (Przybyłek, Karpiński, 2019). A própolis possui

muitas atividades biológicas benéficas: antioxidante, antibacteriana, antiparasitária, anti-inflamatória, antiproliferativa, antitumoral, dentre outras (Machado et al., 2016; Silva et al., 2017).

Suas propriedades antimicrobianas e antibiofilme são extensivamente relatadas contra diversos microrganismos: *S. aureus* (de Azevedo et al., 2022), *Fusobacterium nucleatum*, *Parvimonas micra*, *Prevotella intermedia*, *Porphyromonas gingivalis* e *Porphyromonas endodontalis* (de Sá Assis et al., 2022) e contra cepas clínicas multirresistentes de *P. aeruginosa* e *Klebsiella pneumoniae* (Santos et al., 2020).

Para combater a resistência microbiana, a abordagem de combinações de compostos mostra-se promissora, pois a resistência é menos provável de acontecer na utilização de compostos combinados do que contra constituintes ativos individuais. As misturas de produtos naturais oferecem um recurso valioso para o desenvolvimento de medicamentos. A sinergia de compostos pode ocorrer por meio de diversos mecanismos: sinergismo farmacodinâmico, sinergismo farmacocinético, eliminação de efeitos adversos e contorno dos mecanismos de resistência (Caesar et al., 2019). A combinação de derivados da canela e da própolis com outras substâncias tem apresentado resultados promissores. No estudo de Barbarossa et al. (2022) foi realizada a combinação da sertralina como um medicamento reposicionado (um fármaco que é conhecido por outras propriedades terapêuticas e que tem potencial para apresentar outra ação farmacológica) com o óleo essencial de canela. A associação resultou em uma forte sinergia contra diversas bactérias Gram-positivas e Gram-negativas, dentre elas *Klebsiella pneumoniae* e *Pseudomonas aeruginosa*.

Um suplemento alimentar contendo a mistura padronizada de extrato de própolis verde brasileira, extrato de folha de oliveira (*Olea europea*) e extrato de casca de tabebuia (*Tabebuia avellanedae*) foi avaliado com relação ao seu potencial sinérgico com antibióticos contra microrganismos causadores de infecções respiratórias. Os extratos mostraram atividade sinérgica com azitromicina e claritromicina contra *S. aureus*, com claritromicina contra *K. pneumoniae* e com claritromicina, azitromicina e amoxiclav contra *H. influenzae* (Ramata-Stunda et al., 2022). Sendo assim, a canela e própolis isolados e combinados têm uso potencial em enxaguatórios bucais, mostrando-se promissores como agentes antimicrobianos na odontologia.

3 PROPOSIÇÃO

O objetivo geral deste estudo foi produzir, a partir da matéria bruta, e caracterizar os extratos de própolis verde de *Baccharis dracunculifolia* e canela (*Cinnamomum verum*), avaliar se a aplicação isolada e combinada dos extratos possuem ação antimicrobiana e antibiofilme sobre cepas clínicas multirresistentes a antibióticos de *Acinetobacter baumannii* e *Pseudomonas aeruginosa* e se possuem citotoxicidade sobre queratinócitos humanos (HaCaT).

Os objetivos específicos do estudo foram:

- a) Avaliar a composição fitoquímica dos extratos de *Cinnamomum verum* e de própolis verde de *Baccharis dracunculifolia* e identificar os principais componentes presentes;
- b) Avaliar a atividade antimicrobiana dos extratos de *Cinnamomum verum* e de própolis verde de *Baccharis dracunculifolia* sobre quatro cepas clínicas multirresistentes a antibióticos de *P. aeruginosa* e *A. baumannii*, determinando concentrações microbicidas e sinérgicas dos extratos pelo método de microdiluição *checkerboard*;
- c) Avaliar a ação das combinações dos extratos vegetais sobre biofilme monoespécie de *P. aeruginosa* e *A. baumannii* com diferentes modalidades: durante a formação do biofilme e após a formação do mesmo com diferentes tempos de contato (5 e 30 min).
- d) Avaliar a citotoxicidade dos extratos vegetais sobre linhagens celulares de queratinócitos humanos (HaCaT).

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Extratos

O extrato hidroetanólico de *Cinnamomum verum* (canela) foi preparado a partir da canela em casca ou canela retirada do tronco adquirida comercialmente (Com-ciência Saúde, São José dos Campos, SP, Brasil) e o extrato hidroetanólico da própolis verde (de *Baccharis dracunculifolia*) foi preparado a partir da própolis bruta cedida pelo fornecedor Apis Brasil (Pindamonhangaba, SP, Brasil). O veículo escolhido para extração foi etanol absoluto (álcool etílico 99.5% - Merck Darmstadt, Alemanha) e água ultrapura obtida em sistema Milli-Q® (EtOH:H₂O / 50:50), seguindo a proporção 30 g da matéria-prima para cada 100 mL do veículo, com tempo de extração de 48 h. Por fim, os extratos foram filtrados em duas etapas: filtração para remoção dos resíduos sólidos (filtro de papel com microfuros) e filtração para esterilização (filtro de membrana 0,22 µm). A figura 1 ilustra o procedimento de extração.

Figura 1 – Etapas do procedimento de extração



Legenda: Preparo da matéria-prima para extração (A e B) e produto vegetal bruto disperso no veículo para produção do extrato (C).

Fonte: Elaborado pela autora.

4.1.1 Avaliação da composição fitoquímica por HPLC

A análise fitoquímica dos extratos foi realizada no laboratório de química de produtos naturais (LabQ) do ICT Unesp em parceria com a Profa. Dra. Maria Cristina Marcucci Ribeiro. A cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) foi utilizada para caracterizar o perfil do conteúdo de marcadores nos extratos. A análise foi realizada em um cromatógrafo líquido de alta eficiência, com um detector de fotodiodos (HPLC-DAD) e um injetor automático modelo D-7000 Merck-Hitachi (Darmstadt, Hesse, Alemanha). As condições cromatográficas foram, fase móvel: solução de ácido fórmico (PA, Merck) diluída na proporção de 95: 5 (solvente A) e metanol grau cromatográfico-Merck (Darmstadt, Hesse, Alemanha, solvente B). O fluxo foi de 1 mL/min e um gradiente linear começando com 0% de B, finalizando com 70% de B, num tempo de corrida de 50 minutos. Os comprimentos de onda de detecção utilizados foram 280 e 340 nm. Os extratos foram formulados e analisados em parceria e sob a supervisão da profa. Dra. Maria Cristina Marcucci Ribeiro.

4.1.2 Teor de Sólidos Solúveis

Foram pesados seis béqueres vazios de 25 mL e os pesos foram anotados. Então, foram pipetados 5 mL dos extratos em cada um deles (triplicata de cada extrato) e em seguida, os mesmos ficaram secando em estufa a 80° C entre 24 a 48h. Após secos, os béqueres foram colocados em dessecador até o total esfriamento e em seguida foram pesados (figura 2).

A quantidade de sólidos solúveis nos extratos foi quantificada a partir da fórmula abaixo:

$$\% \text{ sol. solúveis (m/v)} = \frac{(m-b) \times 100}{V_a}$$

$$\% \text{ sol. solúveis (m/m)} = \% \text{ sol. solúvel (m/v)} / \text{densidade}$$

onde: b = massa do béquer

m = massa final do extrato, após secagem

V = volume pipetado no becker

Figura 2 – Esquema representativo sobre a avaliação do teor de sólidos solúveis dos extratos de própolis (laranja) e canela (vermelho)



Fonte: Elaborado pela autora.

4.2 Bactérias

Foram utilizadas quatro cepas clínicas multirresistentes de *P. aeruginosa* e quatro cepas clínicas multirresistentes de *A. baumannii*, doadas pelos laboratórios clínicos do grupo Policlin Saúde (São José dos Campos, SP) e Valeclin Laboratório de Análises Clínicas (São José dos Campos, SP), sendo o perfil de resistência de cada cepa obtido através do sistema automatizado MicroSCAN AutoSCAN 4® (quadros 1 e 2). Foi avaliada também a ação dos extratos em cepa de referência (*P. aeruginosa* ATCC 15442 e *A. baumannii* ATCC 19606), fornecida pelo Laboratório de Microbiologia e Imunologia do Instituto de Ciência e Tecnologia (ICT - Unesp de São José dos Campos).

Quadro 1- Perfil de resistência a antibióticos de cepas clínicas de *A. baumannii* fornecidas pelo Laboratório do grupo Policlin e Valeclin Laboratório de Análises Clínicas

Antibiótico	Cepas de <i>A. baumannii</i>			
	A1	A2	A3	A4
Ertapenem	R	R	R	R
Imipenem	R	R	R	R
Meropenem	R	R	R	R

Legenda: R: Resistente.

Fonte: Elaborado pela autora com os dados fornecidos pelo Valeclin Laboratório de Análises Clínicas e pelo Laboratório Bioclin do grupo Policlin.

Quadro 2 - Perfil de resistência a antibióticos de cepas clínicas de *P. aeruginosa* fornecidas pelo Laboratório do grupo Policlin e Valeclin Laboratório de Análises Clínicas

Antibiótico	Cepas de <i>P. aeruginosa</i>			
	P1	P2	P3	P4
Amicacina	R	R	S	R
Aztreonam	R	I	R	R
Cefepime	R	R	R	S
Ceftazidima	R	R	R	S
Ciprofloxacina	R	S	R	R
Colistina	I	R	-	-
Gentamicina	R	R	S	R
Imipenem	R	R	I	R
Levofloxacina	R	S	R	R
Meropenem	R	R	R	R
Piperacilina/Tazobactam	R	I	I	S
Polimixina B	-	-	-	S
Tobramicina	R	-	-	R

Legenda: S: sensível; R: Resistente; I: Intermediário; -: Teste não desenvolvido.

Fonte: Dados fornecidos pelo Valeclin Laboratório de Análises Clínicas e pelo Laboratório Bioclin do grupo Policlin.

4.3 Atividade antimicrobiana dos extratos

As cepas bacterianas foram cultivadas (37°C/24 h) em ágar BHI (Brain Heart Infusion – HiMedia® Mumbai, Índia) e em seguida, foram realizadas as preparações das suspensões microbianas onde colônias das respectivas cepas foram diluídas em solução salina estéril (NaCl 0,9%) e homogeneizado em Vortex por 10 s para posterior padronização conforme a necessidade de cada protocolo.

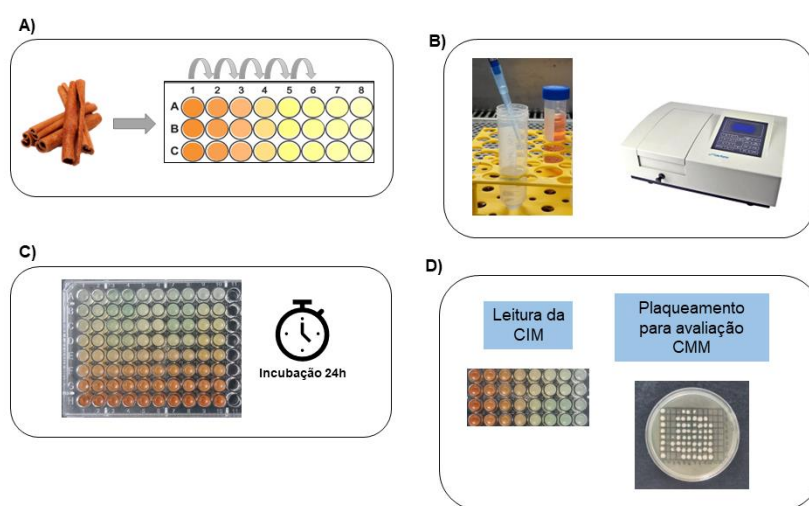
4.3.1 Determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM) e Concentração Microbicida Mínima (CMM) dos extratos vegetais

Foi utilizado o método de microdiluição em caldo, segundo *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI), norma M7-A9, para a determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM) e da Concentração Microbicida Mínima (CMM) dos extratos isolados para cada cepa bacteriana (figura 3).

O inóculo foi padronizado em espectrofotômetro (Micronal B-582, São Paulo, Brasil) utilizando-se o comprimento de onda de 625 nm e densidade óptica de 0,080, resultando em uma suspensão padrão de 1×10^8 células bacterianas por mililitro. Em seguida, as suspensões foram diluídas para a concentração final de 1×10^6 células/mL. Em diferentes microplacas (Kasvi K12-096, São José do Pinhais, Brasil), foram realizadas 10 diluições seriadas (1:2) dos extratos em meio de cultura Mueller Hinton (HiMedia® Mumbai, Índia). Alíquotas de 100 µL de cada suspensão microbiana foram adicionadas em todos os poços. Após incubação por 24 h a 37°C, a CIM foi determinada no último poço da microplaca que não apresentou turvações que indiquem crescimento microbiano. Este teste foi realizado em triplicata. Para que a Concentração Microbicida Mínima (CMM) dos extratos fosse determinada, alíquotas de todos os poços foram semeados ágar BHI e levado para incubação a 37°C por 48 h. A CMM de cada extrato para cada cepa bacteriana (clínica e padrão) foi determinada em placas sem crescimento de colônias. Um grupo tratado com o veículo

(EtOH:H₂O / 50:50) foi acrescentado, a fim de se verificar possível interferência na atividade antibacteriana dos extratos.

Figura 3 – Sequência representativa do procedimento para a determinação da CIM e CMM dos extratos de canela e própolis



Legenda: A) extrato de canela diluído em microplaca contendo meio de cultura Mueller Hinton; B) Inóculo sendo preparado para padronização em espectrofotômetro; C) Microplaca pronta para incubação por 24h a 37 °C; D) Resultado da CIM e CMM.

Fonte: Elaborado pela autora.

4.3.2 Método de microdiluição *Checkerboard* das associações

Foi utilizada a técnica “tabuleiro de xadrez” (do inglês *checkerboard*) de acordo com Usjak et al. (2019) e Moreno et al. (2020). A técnica é baseada no teste de sensibilidade por microdiluição em caldo, e determina o tipo de interação entre os extratos. O meio de cultura utilizado foi caldo Mueller Hinton e a suspensão bacteriana padronizada em solução salina (1×10^6 células/mL). Para as combinações dos extratos, foram utilizados como referência os valores de CIM previamente obtidos, sendo preparadas 8 concentrações de cada extrato, iniciando com valores acima da CIM seguindo diluições em base 2. Em microplacas de 96 poços, as colunas das extremidades foram utilizadas como controle (C- e controle de esterilidade). Em

seguida, 50 µL de cada diluição do extrato 1 (canela) foram adicionados no eixo x (horizontal) da microplaca enquanto 50 µL das diluições do extrato 2 (própolis verde) foram adicionados no eixo y (vertical) da microplaca, de modo a obter todas as combinações possíveis entre as concentrações dos extratos previamente preparadas. Por fim, foram adicionados 100 µL do inóculo preparado e padronizado em espectrofotômetro, totalizando 200 µL/poço. A placa foi levada para incubação a 37°C/48 h para posterior leitura visual. Para avaliar o efeito sinérgico dos extratos, foi adotado o índice de concentração inibitória fracionária (ICIF), que classifica as combinações em sinérgicas, aditivas, indiferentes ou antagônicas. O ICIF é calculado através da soma da concentração inibitória fracionada (CIF) ou “CIM combinada” do 1º extrato mais a CIF do 2º extrato dividido pela CIM dos extratos isolados. A ICIF pode ser definida como:

$$\text{CIF 1º extrato} / \text{CIM 1º extrato} + \text{CIF 2º extrato} / \text{CIM 2º extrato} = \text{ICIF}$$

onde: CIF = concentração inibitória fracionada

CIM = concentração inibitória mínima

ICIF = índice de concentração inibitória fracionária

Uma combinação será considerada sinérgica quando $\text{ICIF} \leq 0,5$, aditiva quando $\text{ICIF} > 0,5$ e $\leq 1,0$, indiferente quando $\text{ICIF} > 1$ e ≤ 4 e antagonista em $\text{ICIF} > 4,0$. A mesma fórmula será utilizada para calcular o índice de concentração bactericida fracionária (ICBF), usando valores CFM em vez de CIM (Moreno et al., 2020). Para isso, uma alíquota de cada poço foi semeada em ágar BHI. As placas foram incubadas por 24h e foi determinada ICBF de acordo com a ausência de crescimento microbiano nas placas.

4.3.3 Análise da ação antibiofilme dos extratos vegetais

Após avaliação das possíveis combinações de extratos vegetais sobre cepas clínicas de *P. aeruginosa* e *A. baumannii*, o critério de seleção das combinações a

serem estudadas sobre biofilmes foi: combinação dos extratos vegetais em concentrações que apresentem efetividade sobre todas as cepas analisadas. Tal critério baseia-se no fato de que, para o desenvolvimento futuro de um produto odontológico, torna-se necessário focar em combinações que tiveram maior êxito. A análise da combinação de *C. verum* e própolis verde (de *B. dracunculifolia*) em biofilmes foi realizada por meio da avaliação da inibição na formação do biofilme bacteriano (IFBB) e da avaliação na erradicação do biofilme bacteriano já formado (EBBF).

4.3.3.1 Avaliação da inibição na formação do biofilme bacteriano (IFBB)

Baseado no estudo de Topa et al. (2018), para a determinação do IFBB, os tratamentos foram adicionados juntamente com o inóculo padronizado (1×10^7 células/mL) e incubados em placas de 96 poços a 37°C, por 48 horas, com troca do caldo (extratos vegetais diluídos e combinados nas concentrações escolhidas) após 24h. Cada grupo experimental foi composto por n=10. Passado o tempo de incubação, o caldo foi removido e foram realizadas lavagens com solução salina, no intuito de lavar os poços e eliminar células não aderentes que sofreram com a ação dos extratos. Foi realizado o teste de viabilidade celular das células bacterianas no qual foram adicionados 100 µL da solução de MTT (3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-Diphenyltetrazolium Bromide) (Sigma-Aldrich, Jurubatuba, Brasil) em cada poço e a placa foi incubada ao abrigo da luz a 37 °C durante 1h. Passado o período de incubação a solução de MTT foi retirada seguido pela adição de 100 µL de Dimetilsufóxido (DMSO). A placa foi novamente incubada em estufa a 37°C por 10 minutos e colocada no Shaker sob agitação constante por 10 minutos. Em seguida foi obtida as densidades ópticas (DO) por meio de uma leitora de microplaca em 570 nm e as DO obtidas foram convertidas em percentual de atividade metabólica.

4.3.3.2 Avaliação da erradicação do biofilme bacteriano formado (EBBF)

Baseado no estudo de Santos et al. (2020) em microplacas de 96 poços, foram acrescidos 100µL/poço do caldo BHI (*Brain Heart Infusion* - Kasvi). Após preparo e padronização em espectrofotômetro (10^7 células/mL), a suspensão microbiana foi adicionada nas microplacas (100µL/poço) já contendo meio de cultura, totalizando 200µL/poço. As placas foram levadas para incubação 37°/48h para formação do biofilme, com substituição do caldo após 24h de incubação.

Depois da formação do biofilme, os mesmos foram expostos por 5 min ou 30 min aos extratos vegetais diluídos e combinados nas concentrações escolhidas. Meio de cultura foi utilizado como controle negativo e gluconato de clorexidina 0,12% como controle positivo para todas as análises sobre biofilme. Cada grupo experimental foi composto por n=10. Após exposição às combinações dos extratos, o caldo foi removido e foram realizadas lavagens com solução salina para posterior análise da viabilidade celular por meio do teste de MTT.

4.4 Etapa das análises celulares *in vitro*

A análise da citotoxicidade dos extratos de própolis verde (de *B. dracunculifolia*) e *C. verum* (canela) foi realizada sobre as linhagens de queratinócitos humanos (HaCaT) provenientes do Banco de Células do Rio de Janeiro – Associação Técnico Científica Paul Ehrlich (APABCAM – RJ).

4.4.1 Cultivo, manutenção e contagem celular

As linhagens celulares foram cultivadas em meio de Eagle modificado por Dulbecco (DMEM – LGC Biotecnologia, Cotia, Brasil), com alta concentração de glicose, suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB) (Invitrogen, Nova York,

EUA) e mantidas em frascos de cultivo celular (TPP, Suíça), incubadas em estufa à temperatura de 37°C, com umidade atmosférica e 5% de CO₂. Ao atingirem a quantidade necessária, as células foram encaminhadas aos respectivos testes. Para tanto, a monocamada de células foi desagregada do assoalho do frasco de cultivo com tripsina.

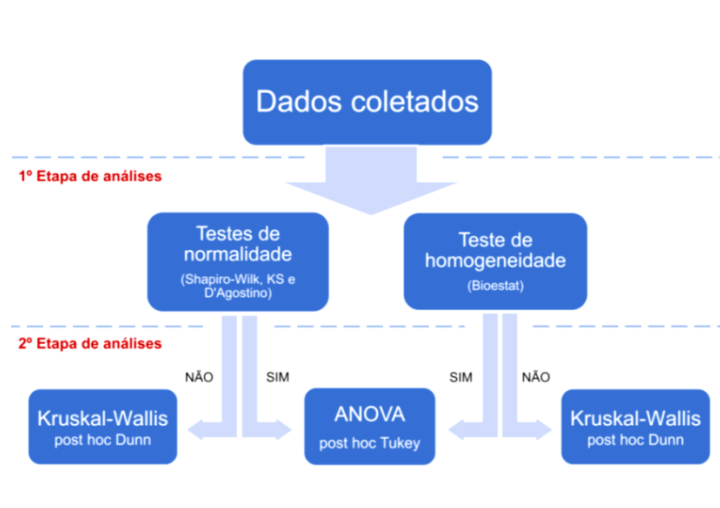
4.4.2 Avaliação da citotoxicidade dos extratos vegetais

A citotoxicidade dos extratos foi verificada por meio do teste colorimétrico de MTT, avaliando-se a atividade enzimática celular. As culturas foram transferidas para microplacas de 96 poços (TPP) na concentração de 2×10^4 células viáveis e cultivadas em 200 µL de meio DMEM + 10% SFB. As placas foram incubadas (37°C, com 5% de CO₂) por 24 h para a aderência celular. Passado o período de incubação, as células foram expostas, por 24 h, aos extratos e aos controles obedecendo os grupos: Pv (própolis), Cv (canela), DMEM (grupo controle negativo aplicação apenas do meio DMEM) e CLX (grupo controle gluconato de clorexidina 0,12%). As concentrações dos extratos vegetais foram baseadas na Concentração Microbiciada Mínima (CMM) encontrada nos experimentos microbiológicos. Então, as células foram submetidas ao teste de MTT, utilizando a suspensão de 0,5 mg do pó de MTT (Sigma-Aldrich, Jurubatuba, Brasil) em 1 mL de DMEM + 10% SFB. A solução foi transferida para as microplacas de 96 poços no volume de 100 µL/poço, seguido pela incubação ao abrigo da luz (37°C, com 5% de CO₂) por 4 h. Posteriormente a solução foi descartada e 100 µL/poço de dimetilsulfóxido (DMSO – Sigma) foram adicionados. Após incubação de 10 min e agitação em shaker, a absorbância dos poços foi lida em leitora de microplacas com comprimento de onda de 570 nm. As densidades ópticas (DO) obtidas foram convertidas em percentual de viabilidade celular.

4.5 Análise Estatística

Todos os dados foram avaliados quanto a normalidade por meio dos testes: Shapiro-Wilk, Kolmogorov-Smirnov e D'Agostino & Pearson omnibus e quanto a homogeneidade por meio do software Bioestat. Se os dados apresentaram normalidade e homogeneidade foram analisados por ANOVA e Teste de Tukey, caso contrário, pelo teste de Kruskal-Wallis e Teste de Dunn. Foi utilizado o programa GraphPad Prism 5.0, considerando-se nível de significância de 5%, conforme ilustrado na figura 4.

Figura 4 - Fluxograma das etapas da análise estatística



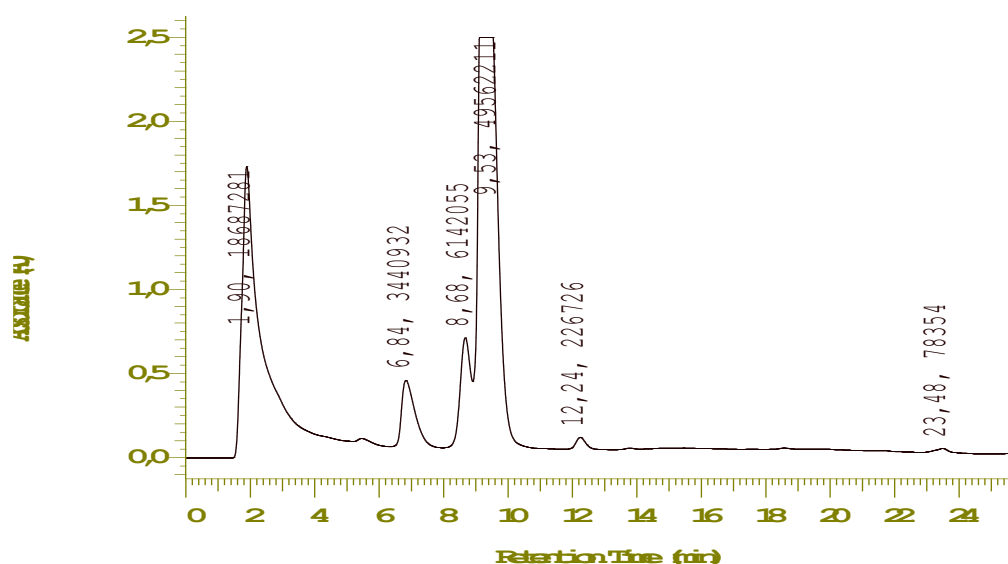
Fonte: Elaborado pela autora.

5 RESULTADO

5.1 Avaliação da composição fitoquímica por HPLC

Por meio da análise cromatográfica do extrato de *C. verum*, foi possível identificar o composto aldeído cinâmico no tempo de retenção de 9,5 min (figura 5).

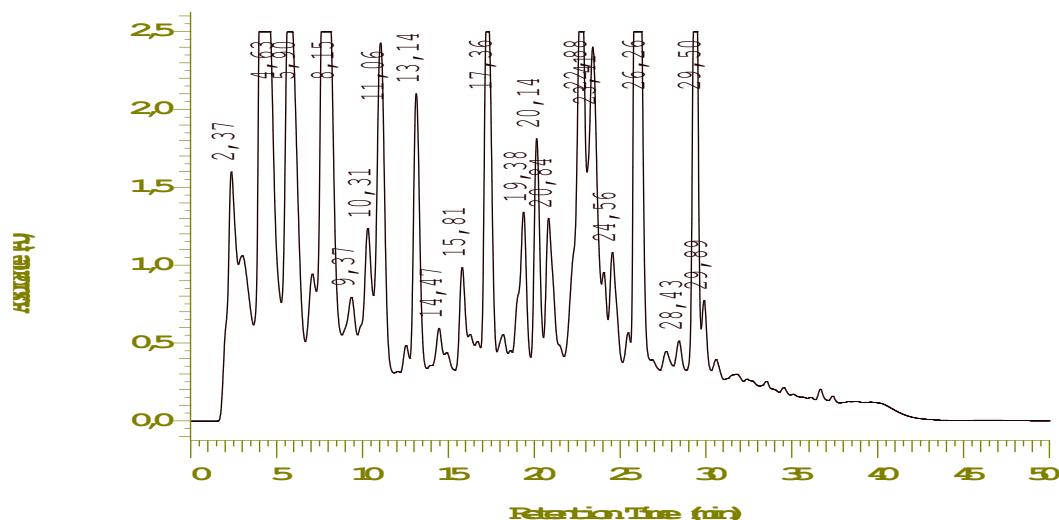
Figura 5 - Cromatograma do extrato hidroalcólico de *C. verum*. Comprimento de onda do cromatograma a 280 nm



Fonte: Elaborado pela autora.

Na análise cromatográfica do extrato de própolis de *B. dracunculifolia*, foi possível identificar os seguintes compostos: ácido clorogênico em diferentes tempos de retenção (2,35 min e 3,06 min), derivado do ácido cinâmico (ácido sinápico em 10,27 min) e o flavonoide apigenina no tempo de retenção 19,28 min (figura 6).

Figura 6 - Cromatograma do extrato de própolis verde de *B. dracunculifolia*. Comprimento de onda do cromatograma a 280 nm



Fonte: Elaborado pela autora.

5.2 Extratos vegetais: teor de sólidos solúveis / Resíduo seco

A análise do teor de sólidos solúveis para as amostras de canela (*C. verum*), considerando o veículo hidroalcolico, foi de 3,59%. Já para a amostra de própolis (*B. dracunculifolia*), também considerando o resíduo seco da amostra diluída em EtOH+H₂O foi de 8,04%.

5.3 Determinação da CIM e CMM dos extratos isolados

No teste de microdiluição em caldo, não foi possível realizar a leitura visual para determinação da CIM dos extratos vegetais, visto que os mesmos possuem coloração intensa e por vezes, notava-se sedimentos no fundo da placa, próprio dos extratos vegetais. Para todas as cepas, os extratos apresentaram CMM e o veículo não produziu interferências na atividade antibacteriana. Para *A. baumannii*, o extrato

de canela (*C. verum*) apresentou CMM de 0,22% a 0,44% e o extrato de própolis (*B. dracunculifolia*) de 0,50% a 1,00%. Já sobre *P. aeruginosa*, a canela apresentou CMM de 0,05% a 0,44% e o própolis de 0,12% a 2,01% (tabela 1).

Tabela 1 - CMM determinada para cepas de *A. baumannii* e *P. aeruginosa*

Extrato (%)	Cepa bacteriana: <i>Acinetobacter baumannii</i>				
	ATCC	A1	A2	A3	A4
canela	0,22 %	0,44%	0,44%	0,44%	0,44%
própolis	1,00%	0,50%	1,00%	0,50%	0,50%
Extrato (%)	Cepa bacteriana: <i>Pseudomonas aeruginosa</i>				
	ATCC	P1	P2	P3	P4
canela	0,05 %	0,11%	0,44%	0,05%	0,44%
própolis	0,12%	0,25%	2,01%	0,12%	2,01%

Fonte: Elaborado pela autora.

5.4 Efeito das combinações dos extratos vegetais

5.4.1 Sobre *Acinetobacter baumannii*

De acordo com o cálculo de ICBF (Índice de Concentração Bactericida Fracionário), a combinação dos extratos de canela e própolis apresentaram valores aditivos e uma combinação sinérgica foi encontrada para cepa clínica A2 (tabela 2). Quando analisada a redução da CMM, pode-se verificar que a combinação promoveu reduções significativas.

Tabela 2 - Resultados da combinação dos extratos de canela e própolis sobre cepas de *A. baumannii* com valores e classificação do ICBF e quantas vezes foram reduzidas a CMM isolada de cada extrato

Cepa: <i>A.b.</i>	CMM EXC (%)	CMM EXP (%)	CMM comb. EXC (%)	CMM comb. EXP (%)	ICBF	Red. CMM EXC	Red. CMM EXP	Efeito
ATCC	0,22	1,00	0,11	0,50	1,00	2x	2x	aditivo
			0,05	0,50	0,72	4x	2x	aditivo
A1	0,44	0,5	-	-	-	-	-	-
A2	0,44	1,0	0,22	0,50	1,00	2x	2x	aditivo
			0,11	0,50	0,75	4x	2x	aditivo
			0,05	0,50	0,61	8x	2x	aditivo
			0,02	0,50	0,54	20x	2x	aditivo
			0,01	0,50	0,53	40x	2x	aditivo
			0,22	0,25	0,75	2x	4x	aditivo
			0,11	0,25	0,50	4x	4x	sinérgico
			0,22	0,12	0,62	2x	8x	aditivo
A3	0,44	1,0	0,22	0,50	1,00	2x	2x	aditivo
			0,11	0,50	0,75	4x	2x	aditivo
A4	0,44	0,5	-	-	-	--	-	-

Legenda: CMM: Concentração Bactericida Mínima; EXC: extrato de canela; EXP: extrato de própolis; CMM comb.: Concentração Microbicida Mínima Combinada; ICBF: Índice de Concentração Bactericida Fracionado; Red.: redução. -: não foram encontradas sinérgicas ou aditivas.

Fonte: Elaborado pela autora.

5.4.2 Sobre *Pseudomonas aeruginosa*

A combinação de canela e própolis apresentou combinações aditivas e uma combinação sinérgica também foi encontrada sobre cepa clínica P1. Reduções de até 34x a CMM isolada dos extratos foi encontrada (tabela 3).

Tabela 3 - Resultados da combinação dos extratos de canela e própolis sobre cepas de *P. aeruginosa* com valores e classificação do ICBF e quantas vezes foram reduzidas a CMM isolada de cada extrato

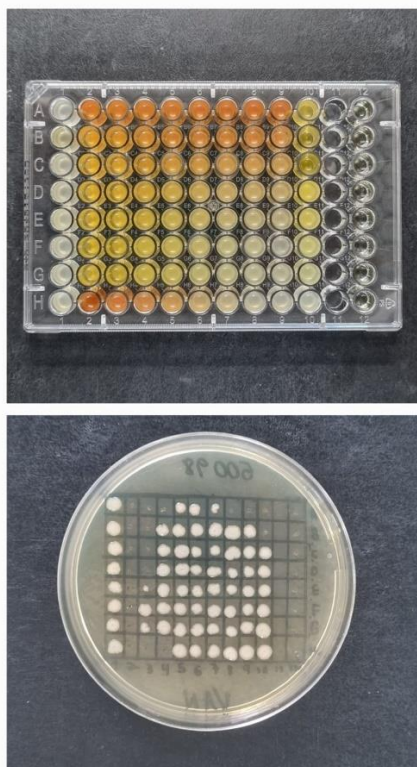
Cepa: <i>P.a.</i>	CMM EXC (%)	CMM EXP (%)	CMM comb. EXC (%)	CMM comb. EXP (%)	ICBF	Red. CMM EXC	Red. CMM EXP	Efeito
ATCC	0,05	0,12	0,02	0,06	0,90	2x	2x	aditivo
P1	0,11	0,25	0,05	0,12	0,93	2x	2x	aditivo
			0,02	0,12	0,66	5x	2x	aditivo
			0,05	0,007	0,47	2x	34x	sinérgico
P2	0,44	2,01	0,22	1,00	1,00	2x	2x	aditivo
P3	0,05	0,12	-	-	-	-	-	-
P4	0,44	2,01	0,22	1,00	1,00	2x	2x	aditivo

Legenda: CMM: Concentração Microbicida Mínima; EXC: extrato de canela; EXP: extrato de própolis; CMM comb.: Concentração Microbicida Mínima Combinada; ICBF: Índice de Concentração Bactericida Fracionado; Red.: redução. -: não foram encontradas sinérgicas ou aditivas.

Fonte: Elaborado pela autora.

Na figura 7, pode-se visualizar as microplacas sendo empregadas para avaliação do sinergismo dos extratos sobre as cepas bacterianas. Alíquotas foram semeadas para realização do cálculo ICBF (índice de concentração bacteriana fracionária).

Figura 7 - Avaliação do sinergismo por meio da técnica “checkerboard”



Fonte: Elaborado pela autora.

5.5 Atividade antibiofilme dos extratos vegetais

As combinações selecionadas para prosseguir com as análises em biofilmes foram nomeadas de acordo com os poços identificados no experimento do *Checkerboard*: combinação 3B (0,22% canela + 0,50% própolis) e combinação 3C (0,11% canela + 0,50% própolis). A tabela 4 demonstra as concentrações das combinações 3B e 3C selecionadas para investigar a ação antibiofilme.

Tabela 4 – Composição das concentrações de cada extrato vegetal nas combinações analisadas sobre biofilmes

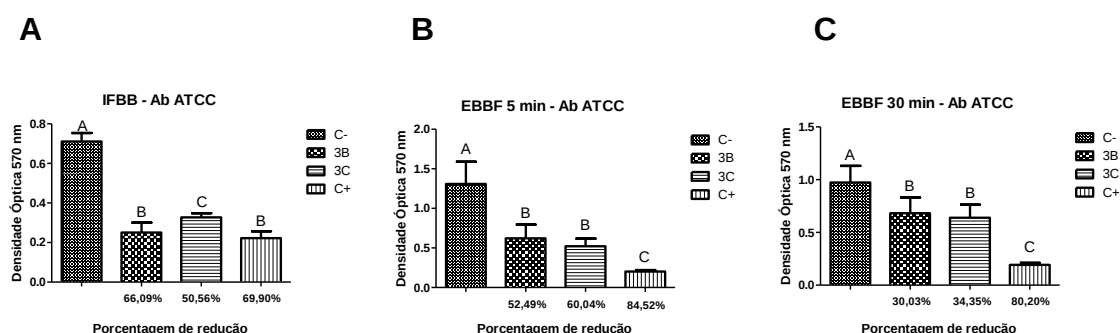
Combinação	Concentração (%) dos extratos nas combinações	
	<i>C. verum</i>	<i>B. dracunculifolia</i>
3B	0,22%	0,50%
3C	0,11%	0,50%

Fonte: Elaborado pela autora.

5.5.1 Sobre *Acinetobacter baumannii*

Sobre a cepa ATCC, reduções significativas ($p < 0,05$) podem ser observadas em todas as modalidades analisadas e nos diferentes tempos de contato (5 min e 30 min). Nas análises da Inibição na Formação do Biofilme Bacteriano (IFBB) de *A. baumannii*, a combinação 3B foi capaz de inibir a formação de modo semelhante ($p > 0,05$) ao controle positivo, com porcentagens de redução de 66,09%, comparado a clorexidina que reduziu a formação do biofilme em 69,90% (figura 8).

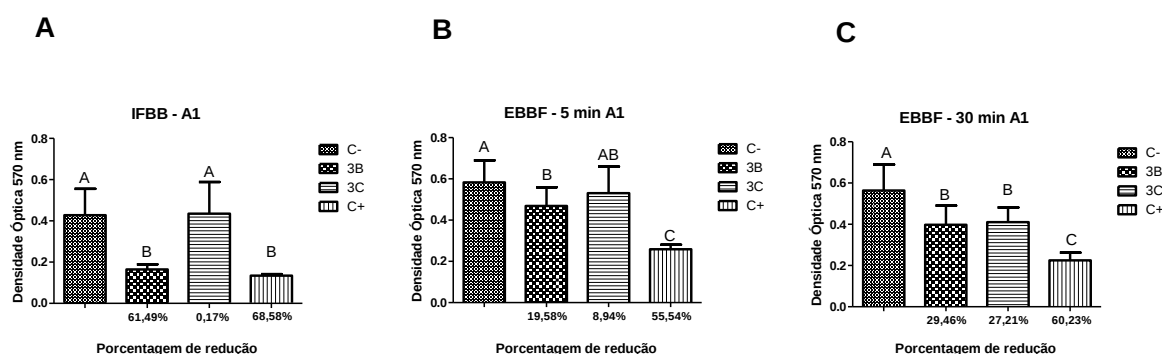
Figura 8 - Avaliação da viabilidade celular da cepa ATCC de *A. baumannii* em biofilme após o tratamento com os extratos em diferentes modalidades e tempos de exposição



Legenda: letras diferentes indicam grupos estatisticamente diferentes. Valores médios $\pm$ desvio padrão da leitura da densidade óptica (570 nm) do biofilme de *A. baumannii* após exposição aos extratos vegetais combinados, sendo 3B (0,22% canela + 0,50% própolis) e 3C (0,11% canela + 0,50% própolis) durante a formação do biofilme (A) após o biofilme formado por 5 min (B) e 30 min (C). (n = 10. ANOVA, teste de Tukey ou Kruskal Wallis, teste de Dunn, $p \leq 0,05$). Fonte: Elaborado pela autora.

Sobre a cepa clínica A1 na modalidade IFBB, observa-se que a combinação 3B inibiu a formação em 61,49% apresentando semelhança estatística ($p > 0,05$) a clorexidina (C+) que reduziu a formação do biofilme desta cepa em 68,48%. Na modalidade de avaliação da Erradicação do Biofilme Bacteriano Formado (EBBF), a combinação 3B em contato por 5 min diferiu estatisticamente ($p < 0,05$) do controle sendo capaz de eliminar 19,58% do biofilme formado. A combinação 3C não diferiu do grupo controle na modalidade IFBB e EBBF - 5 min. No tempo de contato de 30 min, os extratos produziram reduções acima de 25% do biofilme formado e ambas combinações diferiram estaticamente do controle negativo ($p < 0,05$) (figura 9).

Figura 9 - Avaliação da viabilidade celular da cepa clínica A1 de *A. baumannii* em biofilme após o tratamento com os extratos em diferentes modalidades e tempos de exposição

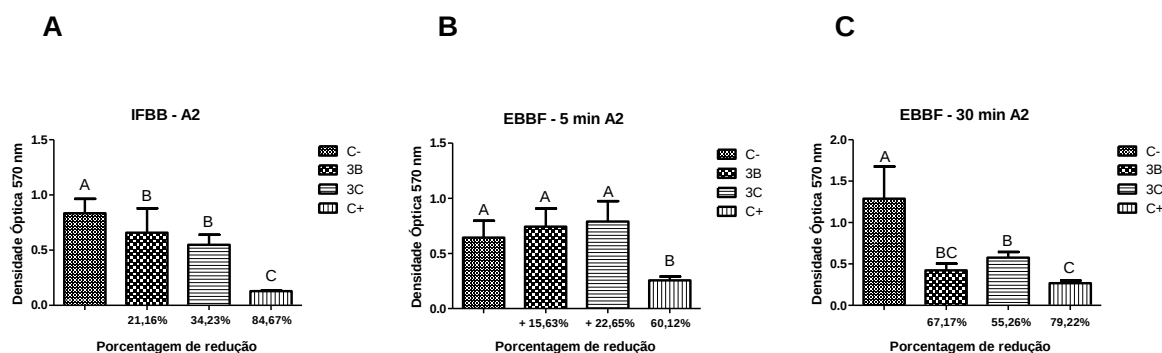


Legenda: letras diferentes indicam grupos estatisticamente diferentes. Valores médios $\pm$ desvio padrão da leitura da densidade óptica (570 nm) do biofilme de *A. baumannii* após exposição aos extratos vegetais combinados, sendo 3B (0,22% canela + 0,50% própolis) e 3C (0,11% canela + 0,50% própolis) durante a formação do biofilme (A) e após o biofilme formado por 5 min (B) e 30 min (C). ($n = 10$. ANOVA, teste de Tukey ou Kruskal Wallis, teste de Dunn, $p \leq 0,05$). Fonte: Elaborado pela autora.

Com relação as análises sobre a cepa clínica A2, pode-se observar diferença estatística significativa ($p < 0,05$) quando os extratos combinados foram aplicados para inibir a formação do biofilme (IFBB) sendo as taxas de redução de 21,16% (3B) e 34,23% (3C). Para erradicação da comunidade microbiana (EBBF) desta cepa clínica, o período de contato por 5 min não diferiu estatisticamente do controle negativo ($p > 0,05$) e apenas o controle positivo produziu reduções relevantes (60,12%

sendo $p < 0,05$) quando comparado ao controle negativo. Contudo, durante a exposição por 30 min, observa-se reduções expressivas de pelo menos 50% de erradicação do biofilme (3B e 3C), com taxa de redução da combinação 3B de 67,17% atuando de modo semelhante a clorexidina (79,22%) e todos os grupos diferindo estatisticamente do controle negativo ($p < 0,05$) (figura 10).

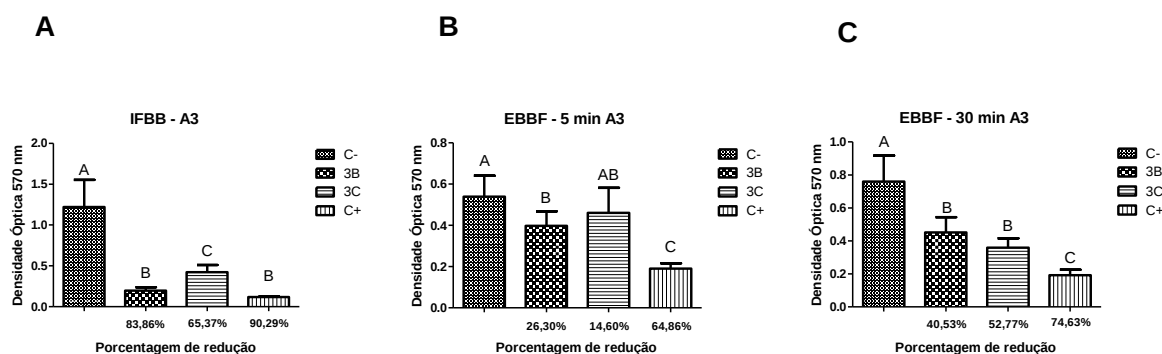
Figura 10 - Avaliação da viabilidade celular da cepa clínica A2 de *A. baumannii* em biofilme após o tratamento com os extratos em diferentes modalidades e tempos de exposição



Legenda: letras diferentes indicam grupos estatisticamente diferentes. Valores médios $\pm$ desvio padrão da leitura da densidade óptica (570 nm) do biofilme de *A. baumannii* após exposição aos extratos vegetais combinados, sendo 3B (0,22% canela + 0,50% própolis) e 3C (0,11% canela + 0,50% própolis) durante a formação do biofilme (A) e após o biofilme formado por 5 min (B) e 30 min (C). ($n = 10$. ANOVA, teste de Tukey ou Kruskal Wallis, teste de Dunn, $p \leq 0,05$). Fonte: Elaborado pela autora.

Sobre a cepa A3, independente da modalidade de aplicação (IFBB ou EBBF) os extratos vegetais foram atuantes, produzindo reduções significativas quando comparados estatisticamente ao controle negativo ($p < 0,05$). Destaca-se as reduções encontradas na modalidade IFBB, pois todos os grupos produziram inibição na formação do biofilme de pelo menos 60% quando comparado ao controle negativo ($p < 0,05$). A atuação da combinação 3B foi a mais expressiva com 83,86% de redução, atuando de maneira semelhante ($p > 0,05$) a clorexidina que inibiu em 90,29% a formação do biofilme. Na modalidade EBBF, os extratos vegetais no tempo de contato por 30 min apresentaram percentuais de redução de 40,53% (3B) e 52,77% (3C) (figura 11).

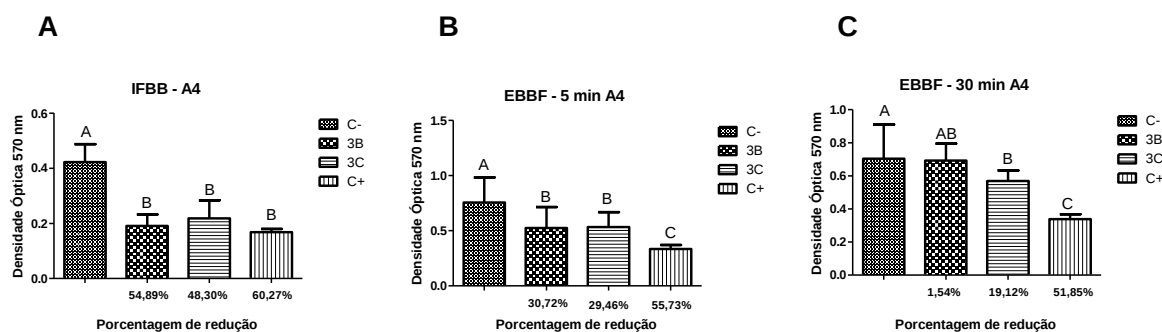
Figura 11 - Avaliação da viabilidade celular da cepa clínica A3 de *A. baumannii* em biofilme após o tratamento com os extratos em diferentes modalidades e tempos de exposição



Legenda: letras diferentes indicam grupos estatisticamente diferentes. Valores médios $\pm$ desvio padrão da leitura da densidade óptica (570 nm) do biofilme de *A. baumannii* após exposição aos extratos vegetais combinados, sendo 3B (0,22% canela + 0,50% própolis) e 3C (0,11% canela + 0,50% própolis) durante a formação do biofilme (A) e após o biofilme formado por 5 min (B) e 30 min (C). (n = 10. ANOVA, teste de Tukey ou Kruskal Wallis, teste de Dunn, $p \leq 0,05$). Fonte: Elaborado pela autora.

Em relação a última cepa clínica analisada, A4, os extratos foram atuantes na inibição da formação do biofilme (IFBB), independente da combinação utilizada sendo que 3B promoveu taxa de inibição da formação de 54,89% e 3C de 48,30%. Tais reduções foram semelhantes a clorexidina (60,27%) e todos os grupos diferiram estatisticamente do controle negativo ($p < 0,05$). Para erradicação (EBBF), o protocolo de aplicação por 5 min apresentou reduções significativas ($p < 0,05$) independente da combinação utilizada (3B - 30,72% e 3C - 29,46%). Por 30 min, apenas a clorexidina (51,85%) e combinação 3C (19,12%) diferiram estatisticamente do controle negativo ($p < 0,05$) (figura 12).

Figura 12 - Avaliação da viabilidade celular da cepa clínica A4 de *A. baumannii* em biofilme após o tratamento com os extratos em diferentes modalidades e tempos de exposição

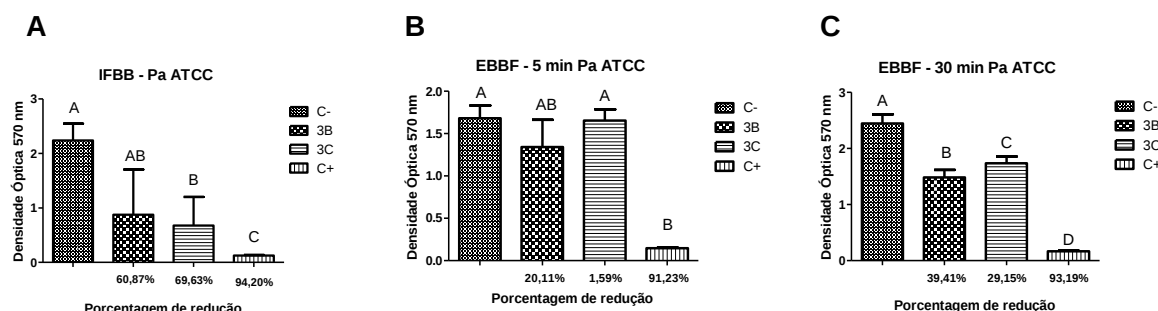


Legenda: letras diferentes indicam grupos estatisticamente diferentes. Valores médios $\pm$ desvio padrão da leitura da densidade óptica (570 nm) do biofilme de *A. baumannii* após exposição aos extratos vegetais combinados, sendo 3B (0,22% canela + 0,50% própolis) e 3C (0,11% canela + 0,50% própolis) durante a formação do biofilme (A) e após o biofilme formado por 5 min (B) e 30 min (C). (n = 10. ANOVA, teste de Tukey ou Kruskal Wallis, teste de Dunn, $p \leq 0,05$). Fonte: Elaborado pela autora.

5.5.2 Sobre *Pseudomonas aeruginosa*

Sobre a cepa ATCC, pode-se observar reduções expressivas na formação do biofilme (IFBB), sendo que a combinação 3B apresentou percentual de redução de 60,87%, 3C de 69,63% e clorexidina de 94,20% com todos os grupos diferindo estatisticamente do controle negativo ($p < 0,05$). Na avaliação da erradicação por 5 min, nenhuma das combinações dos extratos diferiram do controle ($p > 0,05$) e apenas a clorexidina eliminou o biofilme com percentuais expressivos de redução (91,23%) e $p < 0,05$. Por 30 min, todos os grupos diferiram entre si, com taxas de redução de 39,41% (3B), 29,15% (3C) e 93,19% (C+) (figura 13).

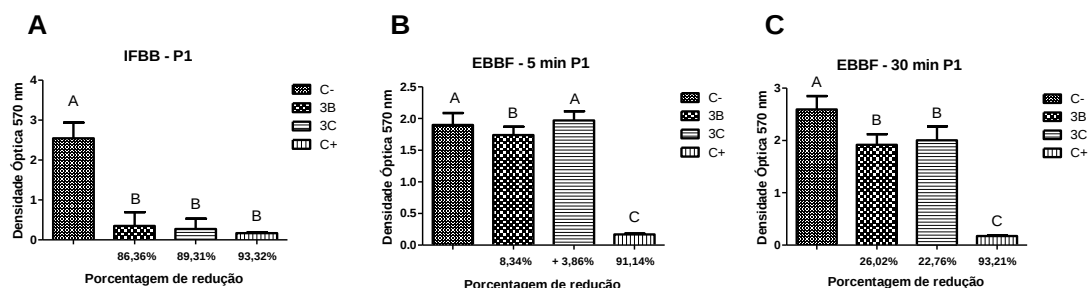
Figura 13 - Avaliação da viabilidade celular da cepa ATCC *P. aeruginosa* em biofilme após o tratamento com os extratos em diferentes modalidades e tempos de exposição



Legenda: letras diferentes indicam grupos estatisticamente diferentes. Valores médios $\pm$ desvio padrão da leitura da densidade óptica (570 nm) do biofilme de *P. aeruginosa* após exposição aos extratos vegetais combinados, sendo 3B (0,22% canela + 0,50% própolis) e 3C (0,11% canela + 0,50% própolis) durante a formação do biofilme (A) e após o biofilme formado por 5 min (B) e 30 min (C). (n = 10. ANOVA, teste de Tukey ou Kruskal Wallis, teste de Dunn, $p \leq 0,05$). Fonte: Elaborado pela autora.

Nas análises da cepa clínica P1, observa-se que na modalidade IFBB todos os grupos produziram importante redução na formação do biofilme, todos com percentual acima de 85%. As combinações atuaram de modo semelhante a clorexidina e todos diferiram estatisticamente do controle negativo ($p < 0,05$). Para avaliação da erradicação do biofilme formado, o tempo de 30 min apresentou maiores percentuais de redução, sendo 26,02%, 22,76% e 93,21% para 3B, 3C e clorexidina respectivamente e todos diferiram do controle ($p < 0,05$). Por 5 min, apenas a aplicação de 3B e clorexidina apresentaram diferença estatística quando comparado ao controle ($p < 0,05$) (figura 14).

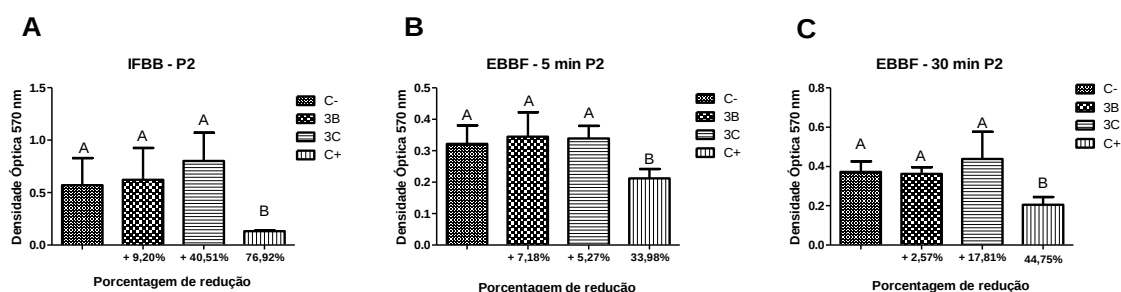
Figura 14 - Avaliação da viabilidade celular da cepa clínica P1 de *P. aeruginosa* em biofilme após o tratamento com os extratos em diferentes modalidades e tempos de exposição



Legenda: letras diferentes indicam grupos estatisticamente diferentes. Valores médios $\pm$ desvio padrão da leitura da densidade óptica (570 nm) do biofilme de *P. aeruginosa* após exposição aos extratos vegetais combinados, sendo 3B (0,22% canela + 0,50% própolis) e 3C (0,11% canela + 0,50% própolis) durante a formação do biofilme (A) e após o biofilme formado por 5 min (B) e 30 min (C). (n = 10. ANOVA, teste de Tukey ou Kruskal Wallis, teste de Dunn, $p \leq 0,05$). Fonte: Elaborado pela autora.

Sobre a cepa clínica P2, não houve atuação dos extratos que diferisse do controle negativo ($p > 0,05$). Em alguns grupos é possível observar discreto aumento da viabilidade celular. Apenas a clorexidina foi atuante em todas as modalidades e nos diferentes tempos de contato contra a cepa clínica P2 ($p < 0,05$) (figura 15).

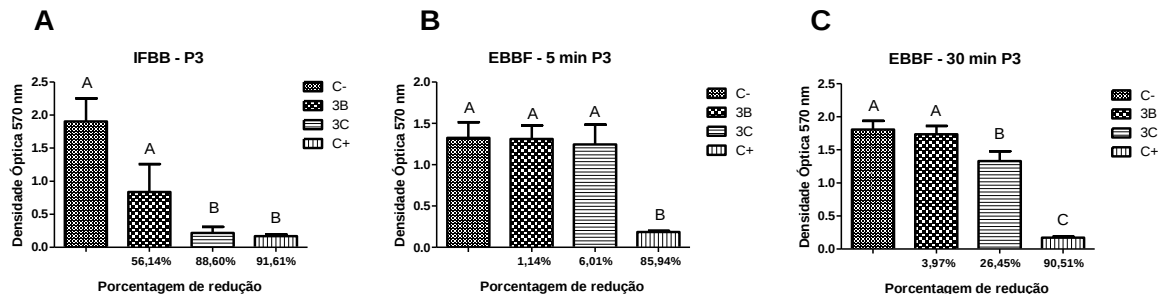
Figura 15 - Avaliação da viabilidade celular da cepa clínica P2 de *P. aeruginosa* em biofilme após o tratamento com os extratos em diferentes modalidades e tempos de exposição



Legenda: letras diferentes indicam grupos estatisticamente diferentes. Valores médios $\pm$ desvio padrão da leitura da densidade óptica (570 nm) do biofilme de *P. aeruginosa* após exposição aos extratos vegetais combinados, sendo 3B (0,22% canela + 0,50% própolis) e 3C (0,11% canela + 0,50% própolis) durante a formação do biofilme (A) após o biofilme formado por 5 min (B) e 30 min (C). (n = 10. ANOVA, teste de Tukey ou Kruskal Wallis, $p \leq 0,05$). Fonte: Elaborado pela autora.

Nas análises antibiofilme sobre a cepa clínica P3, reduções importantes na formação do biofilme (IFBB) podem ser observadas, sendo que a combinação 3B promoveu 56,14% de redução mas sem diferença estatística ($p > 0,05$). A combinação 3C apresentou percentual de redução de 88,60%, atuando de modo semelhante a clorexidina com 91,61% e ambos diferiram estatisticamente do controle ($p < 0,05$). Na modalidade para avaliar o potencial de erradicação do biofilme, em 5 min, os extratos vegetais combinados não apresentaram atuação, sendo que apenas a clorexidina diferiu do controle ($p < 0,05$). Por 30 min, a combinação 3C apresentou 26,45% de erradicação do biofilme formado com diferença estatística ($p < 0,05$) assim como a clorexidina com 90,51% ($p < 0,05$) (figura 16).

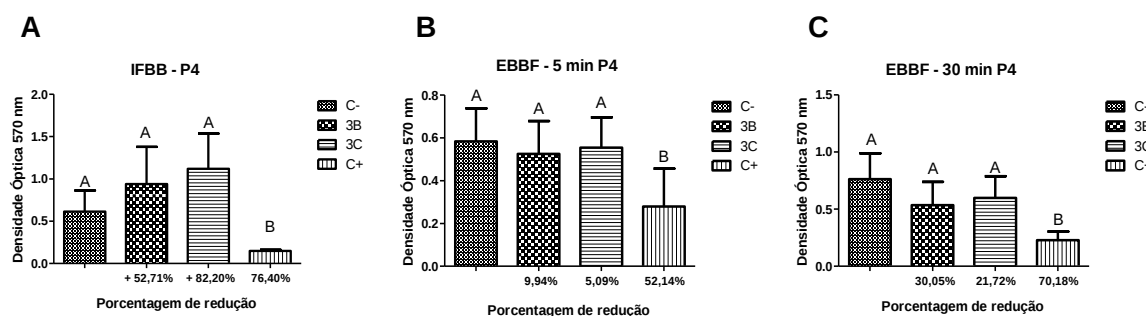
Figura 16 - Avaliação da viabilidade celular da cepa clínica P3 de *P. aeruginosa* em biofilme após o tratamento com os extratos em diferentes modalidades e tempos de exposição



Legenda: letras diferentes indicam grupos estatisticamente diferentes. Valores médios $\pm$ desvio padrão da leitura da densidade óptica (570 nm) do biofilme de *P. aeruginosa* após exposição aos extratos vegetais combinados, sendo 3B (0,22% canela + 0,50% própolis) e 3C (0,11% canela + 0,50% própolis) durante a formação do biofilme (A) e após o biofilme formado por 5 min (B) e 30 min (C). ($n = 10$. ANOVA, teste de Tukey ou Kruskal Wallis, teste de Dunn, $p \leq 0,05$). Fonte: Elaborado pela autora.

Nas análises da ação antibiofilme dos extratos vegetais sobre cepa clínica P4, não foram encontradas reduções significativas em nenhuma das modalidades ($p > 0,05$), e novamente, em alguns grupos, é possível observar aumento da viabilidade celular. Apenas a clorexidina diferiu do grupo controle ($p < 0,05$) (figura 17).

Figura 17 - Avaliação da viabilidade celular da cepa clínica P4 de *P. aeruginosa* em biofilme após o tratamento com os extratos em diferentes modalidades e tempos de exposição



Legenda: letras diferentes indicam grupos estatisticamente diferentes. Valores médios $\pm$ desvio padrão da leitura da densidade óptica (570 nm) do biofilme de *P. aeruginosa* após exposição aos extratos vegetais combinados, sendo 3B (0,22% canela + 0,50% própolis) e 3C (0,11% canela + 0,50% própolis) durante a formação do biofilme (A) e após o biofilme formado por 5 min (B) e 30 min (C). (n = 10. ANOVA, teste de Tukey ou Kruskal Wallis, teste de Dunn, $p \leq 0,05$). Fonte: Elaborado pela autora.

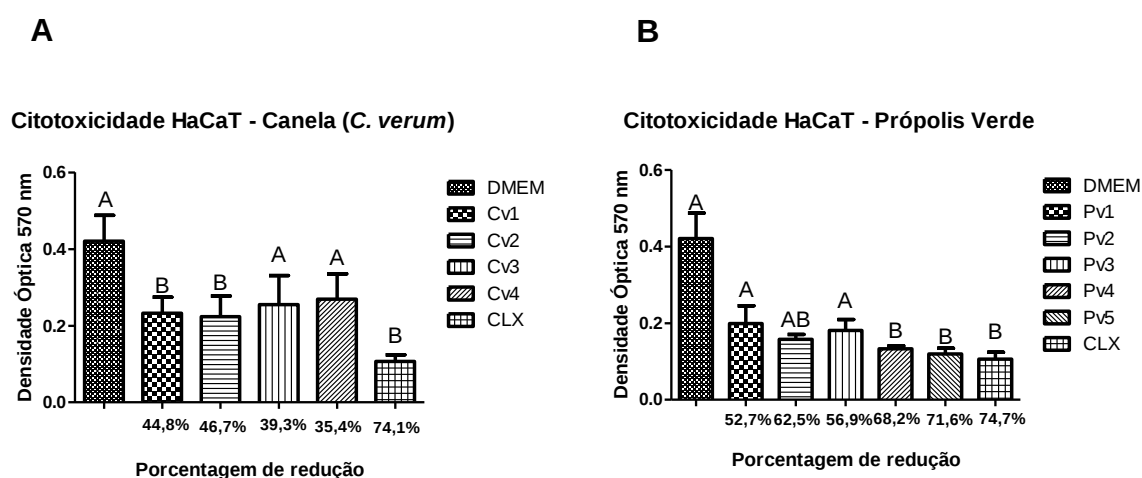
5.5 Citotoxicidade dos extratos vegetais

Em relação a citotoxicidade dos produtos vegetais, foram testadas concentrações baseadas no teste da Concentração Microbicida Mínima (CMM) determinada anteriormente. Para o extrato de *C. verum* (canela) as concentrações foram: 0,44% (Cv1), 0,22% (Cv2), 0,11% (Cv3) e 0,05% (Cv4). Para o extrato de própolis verde (de *B. dracunculifolia*) as concentrações analisadas foram: 2,01% (Pv1), 1,00% (Pv2), 0,50% (Pv3), 0,25% (Pv4) e 0,12% (Pv5).

Quando analisado o extrato de *C. verum*, verificou-se que apenas as concentrações mais elevadas, Cv1 e Cv2, produziram reduções da viabilidade celular com diferença estatística ($p < 0,05$) quando comparado ao controle DMEM. Nota-se que a redução da viabilidade produzida pela clorexidina 0,12% foi a mais expressiva, 74,1%. As concentrações Cv3 e Cv4 não apresentaram citotoxicidade em linhagens de queratinócitos humanos (HaCaT). Nas análises da citotoxicidade do extrato de própolis verde, as concentrações mais baixas, Pv4 e Pv5, produziram redução da viabilidade com diferença estatística significativa ($p < 0,05$) quando comparado ao controle de crescimento celular. As concentrações mais altas, Pv1, Pv2 e Pv3 não

apresentaram citotoxicidade sobre linhagens de HaCaT. Novamente, a clorexidina apresentou os maiores percentuais de redução (74,7%) e, conseqüentemente, maior toxicidade (figura 18).

Figura 18 - Avaliação da viabilidade celular de queratinócitos humanos (HaCaT) após aplicação dos extratos vegetais em diferentes concentrações por 24 h



Legenda: letras diferentes indicam grupos estatisticamente diferentes. Valores médios $\pm$ desvio padrão da leitura da densidade óptica (570 nm) de queratinócitos humanos (HaCaT) após exposição aos extratos vegetais de canela (A), sendo Cv1 (0,44%); Cv2 (0,22%); Cv3 (0,11%); Cv4 (0,05%) e própolis (B), sendo Pv1 (2,01%); Pv2 (1,0%); Pv3 (0,50%); Pv4 (0,25%) e Pv5 (0,12%) por 24h. (n = 10. ANOVA, teste de Tukey ou Kruskal Wallis, teste de Dunn, $p \leq 0,05$).

Fonte: Elaborado pela autora

6 DISCUSSÃO

O cinamaldeído ou aldeído cinâmico, identificado neste estudo, está entre os principais componentes do extrato de *C. verum*. A identificação deste composto no tempo de retenção de 9,5 min está de acordo com os relatos de Kim et al. (2023) no qual o aldeído cinâmico foi identificado no tempo de retenção de 4,06 min.

Os fitoquímicos do extrato da própolis verde identificados no presente estudo foram o ácido clorogênico, derivados do ácido cinâmico e o flavonoide apigenina. Tais achados estão de acordo com o trabalho de Šuran et al. (2021), no qual foram encontrados o ácido p-cumárico, apigenina, kaempferol e ácido cinâmico no extrato de própolis com comprovada ação antimicrobiana contra *S. aureus*, *E. coli*, *P. aeruginosa*, *K. pneumoniae*, *Bacillus cereus* e *C. albicans*. A rica composição da própolis em metabólitos secundários promove este produto apícola como substância promissora para atuação contra bactérias multirresistentes, uma vez que a atuação dos compostos em conjunto pode dificultar o surgimento de resistência microbiana (Przybyłek, Karpiński, 2019).

No presente estudo, 100% dos isolados de *P. aeruginosa* apresentaram resistência ao meropenem, 75% ao imipenem e 100% dos isolados clínicos de *A. baumannii* apresentaram resistência aos carbapenêmicos. No estudo de Gaber et al. (2020) durante a coleta de isolados bacterianos de pacientes com pneumonia, 55,6% e 77,8% das cepas clínicas de *P. aeruginosa* apresentavam resistência ao meropenem e imipenem respectivamente, e 100% das cepas clínicas isoladas de *A. baumannii* apresentavam resistência ao meropenem e imipenem. Sobre tais cepas, foram avaliados a ação antibacteriana de produtos apícolas como a própolis, o mel e o veneno da abelha. Foi encontrado o valor médio de CIM de 7,1% e valor médio de CMM de 17,01% da própolis sobre os isolados de *P. aeruginosa* e de *A. baumannii*. Pode-se observar que o presente estudo está de acordo com os resultados encontrados na literatura, pois a CMM da própolis variou de 0,5% a 1,0% sobre *A. baumannii* e de 0,12% a 2,01% sobre *P. aeruginosa*.

Com relação a atividade antimicrobiana do extrato de *C. verum*, não foi possível fazer a comparação dos resultados, pois não foram encontrados estudos na literatura consultada sobre a atividade antimicrobiana do extrato de *C. verum*.

Entretanto, com o óleo essencial de canela foi encontrado um estudo o qual verificou-se a potente atividade contra *S. aureus*, *E. coli*, *P. aeruginosa* e *A. baumannii* com halo de inibição chegando a 16 mm contra *P. aeruginosa* e 27,8 mm contra isolados clínicos MDR de *A. baumannii*. Para continuação do estudo, sobre as cepas MDR de *A. baumannii* foram avaliadas a CIM e CMM do óleo. Foi encontrado CIM50 de 0,25 mg/mL e CMM50 de 0,50 mg/mL (Intorasoot et al., 2017). Nossos resultados concordam com tais achados, pois a CMM da canela variou de 2,2 a 4,4 mg/mL para *A. baumannii* e de 0,5 a 4,4 mg/mL para *P. aeruginosa*. Lembrando que nosso estudo utilizou o extrato de canela e não o óleo essencial.

A aplicação de substâncias isoladas, seja de origem vegetal ou sintética, levanta a hipótese do surgimento de resistência microbiana ao longo dos anos. Em um estudo sobre a exposição de *P. aeruginosa* ao cinamaldeído, o principal composto encontrado na canela, foi verificado que a bactéria foi capaz de se adaptar as moléculas do cinamaldeído, regulando positivamente sua bomba de efluxo após vários dias de exposição ao composto. Essa mutação exibiu resistência cruzada a vários antibióticos (Tetard et al., 2022).

Diante do exposto, o estudo da combinação de substâncias tem ganhado força na literatura e análises do sinergismo entre dois tipos de compostos naturais ou algum derivado vegetal associado aos antibióticos tem crescido exponencialmente. Não foram encontrados estudos na literatura consultada que avaliassem a combinação de *C. verum* e própolis verde de *B. dracunculifolia* sobre culturas planctônicas de *A. baumannii* e *P. aeruginosa*, sendo nosso estudo pioneiro.

Nossos resultados destacam-se, pois, foram encontradas dezesseis combinações aditivas (ICIF $>0,5$ e < 1) e duas sinérgicas (ICIF $< 0,5$) contra *A. baumannii* e *P. aeruginosa* com reduções expressivas do valor da Concentração Microbicida Mínima (CMM) de até quarenta vezes. Diante do desafio de multirresistência que as bactérias estudadas apresentam atualmente, os achados são de grande contribuição para ciência, uma vez que o sinergismo de compostos pode ocorrer por meio de diversos mecanismos contornando a resistência microbiana (Caesar et al., 2019). Sabe-se que *A. baumannii* e *P. aeruginosa* podem ser encontrados no biofilme dentário de pacientes internados em unidade de terapia intensiva, o que representa um grande risco para o desenvolvimento de infecções nosocomiais, como a pneumonia broncoaspirativa (Sumi et al., 2007). A higienização

bucal adequada desses pacientes pode prevenir o desenvolvimento de infecções respiratórias (Bellissimo-Rodrigues et al., 2014). As expressivas reduções da CMM também se caracterizam como uma vantagem da combinação, uma vez que possibilita concomitantemente a redução dos efeitos adversos decorridos durante a terapêutica.

Outros estudos avaliando a ação sinérgica de outros produtos vegetais foram encontrados. A ação sinérgica de méis com o antibiótico ciprofloxacina contra uma cepa multirresistente de *E. coli* foi avaliada. Observou-se que a somatória dos méis com o referente antimicrobiano diminuiu a viabilidade celular bacteriana de maneira mais expressiva quando comparado a aplicação da ciprofloxacina sozinha (Jaktaji, Ghalamfarsa, 2021). Análises da ação dos extratos metanólicos de *Dracocephalum kotschy* e *Trachyspermum ammi* contra *P. aeruginosa*, *Shigella dysenteriae*, *E. coli* e *S. aureus* revelaram que a ação antimicrobiana dos extratos em conjunto é superior do que a ação dos extratos isolados, apresentando efeito inibitório muito favorável (Zarei Yazdeli et al., 2021).

Com relação aos resultados da ação antibiofilme dos extratos, foi possível observar que o protocolo IFBB (Inibição da formação do biofilme bacteriano) promoveu percentuais de redução superiores e sobre maior número de cepas quando comparado ao protocolo EBBF (erradicação do biofilme bacteriano formado). Tais achados vislumbram o potencial profilático desses produtos vegetais combinados em formulações antissépticas. Entre todos os resultados, pode-se destacar a atuação da combinação 3B (0,22% canela + 0,50% própolis) sobre a cepa clínica de *A. baumannii* A3, que inibiu a formação do biofilme em 83,86% com desempenho comparável a clorexidina que apresentou percentual de 90,29%. Para eliminação do biofilme, sobre a cepa A2, o protocolo de aplicação por 30 min com a combinação 3B promoveu redução de 67,17%, também com atuação semelhante a clorexidina (79,22%).

Não foram encontrados estudos na literatura consultada sobre a ação antibiofilme da combinação de própolis verde (de *B. dracunculifolia*) e *C. verum*, portanto, não foi possível contrapor de modo fidedigno os achados do presente estudo com os achados da literatura. Com relação a atuação em biofilmes do derivado de um dos compostos analisados em nosso estudo, verificou-se que o óleo essencial de canela atuou na inibição e erradicação do biofilme de cepas clínicas de *A. baumannii*,

com reduções de até 71% do biofilme formado na concentração 1 mg/mL (Ganić et al., 2022).

Sobre biofilme de *P. aeruginosa*, pode-se destacar os resultados encontrados sobre as cepas P1 e P3 que sofreram percentual de inibição da formação expressivos. Sobre P1, a combinação 3B (0,22% canela + 0,50% própolis) reduziu 86,36%, 3C (0,11% canela + 0,50% própolis) reduziu 89,31% e sobre P3, o percentual de redução foi de 88,60% com a combinação 3C (0,11% canela + 0,50% própolis). Ainda que a comparação dos resultados com os achados na literatura não seja tão próxima, é possível avaliar que a associação de *C. verum* e própolis verde de *B. dracunculifolia* apresentou resultados positivos, uma vez que no estudo de Kalia et al. (2015), apenas o óleo essencial de *C. verum* promoveu inibição do biofilme de *P. aeruginosa* com redução de até 54% na produção de substrato polimérico quando aplicado na concentração de 0,2 µl/mL. Foi demonstrada a capacidade do óleo essencial de *Cinnamomum* spp. em atuar sobre biofilme de *P. aeruginosa* com mecanismos de ação que vão desde ruptura da membrana citoplasmática, capacidade de interferir no sistema *quorum sensing* até inibição da formação de biofilme em concentrações sub-inibitórias (Brackman et al., 2011; Topa et al., 2018). Da mesma forma, o extrato etanólico de própolis isolado foi capaz de promover diminuição na liberação de eDNA de *P. aeruginosa* e consequentemente, afetar a estabilidade do biofilme (Meto et al., 2020). Novamente, não foram encontrados estudos na literatura consultada sobre a ação antibiofilme da combinação de própolis verde (de *B. dracunculifolia*) e *C. verum*, tornando este estudo pioneiro nas análises destes extratos associados.

Quando avaliado os resultados sobre as cepas clínicas P2 e P4, nenhuma combinação promoveu reduções do biofilme, seja durante a formação ou erradicação. Para continuação dos estudos, sugere-se análises fenotípicas e genotípicas para melhor caracterização do biofilme de P2 e P4. Outras combinações de terapias alternativas também podem ser consideradas para análises futuras, como por exemplo, a combinação dos extratos com antibióticos.

No estudo de Abu El-Wafa et al. (2020) foram testados alguns extratos vegetais em combinação com antibióticos. Os extratos de *Rosmarinus officinalis* (alecrim) e *Punica granatum* (romã) juntos apresentaram sinergismo (ICIF < 0,5) com os antibióticos (piperacilina, ceftazidima, imipenem, gentamicina ou levofloxacino) o que reduziu significativamente a CIM dos antimicrobianos contra uma cepa clínica de

P. aeruginosa. A combinação de alecrim, romã e antibiótico alcançaram até 99,6% de erradicação do biofilme de *P. aeruginosa* apresentado o melhor resultado quando comparado a qualquer outra monoterapia avaliada no estudo.

Em suma, nossos resultados sobre a ação antimicrobiana e antibiofilme dos extratos de *C. verum* e própolis verde combinados contra as bactérias multirresistentes são precursores. Visando uma formulação que combine os potenciais de cada produto vegetal, análises sobre os mecanismos de ação desses agentes naturais em conjunto serão importantes. De acordo com a literatura consultada, é notável que nossos resultados trazem contribuições importantes para a ciência no que se refere ao uso de fitoterápicos combinados na modalidade profilática. O presente trabalho revela os extratos vegetais como potenciais agentes antissépticos no combate a resistência antimicrobiana. O propósito será direcionar o desenvolvimento desta formulação odontológica para a higienização da cavidade bucal de pacientes internados. Para completar o estudo, foram realizadas análises da citotoxicidade, com o objetivo de verificar o potencial de interferência dos extratos vegetais na viabilidade de células humanas.

Quando avaliada a citotoxicidade dos extratos vegetais, nota-se que a clorexidina 0,12% (padrão ouro na antisepsia bucal) possui maior citotoxicidade sobre queratinócitos humanos do que qualquer concentração dos extratos que foram analisadas. Na avaliação do extrato de *C. verum*, os percentuais de viabilidade celular em todas as concentrações analisadas ficaram acima de 50%. Apenas concentrações mais altas (0,44 e 0,22%) diferiam do controle de crescimento celular. Os resultados do presente trabalho estão de acordo com os achados da literatura pois Wijesinghe et al. (2021) verificaram que nenhum efeito citotóxico do óleo essencial de *C. verum* (0-1000 mg/mL) foi detectado sobre linhagens de queratinócitos humanos. O produto vegetal foi mantido em contato com as células por 24 h, nas mesmas condições experimentais.

Quando avaliada a citotoxicidade do extrato de própolis verde, observa-se que as concentrações mais baixas produziram maior toxicidade do que as concentrações mais altas (2,01%, 1,0% e 0,5%). Contudo, novamente é possível observar que a clorexidina mostra o maior percentual de redução da viabilidade dos queratinócitos (74,7%) o que demonstra potencial citotóxico em células epiteliais humanas. No estudo de Bae et al. (2022) também se verificou discreta diminuição da viabilidade

celular em linhagens de HaCaT quando aplicado extrato etanólico da própolis coreana.

Os extratos vegetais utilizados no presente estudo apresentam grande potencial para futuras análises dentro do campo de terapias alternativas, projetando o desenvolvimento de formulações odontológicas que possam ser atuantes contra os microrganismos patogênicos e, portanto, análises sobre o potencial antimicrobiano de *C. verum* e própolis verde contra outras bactérias e fungos de interesse odontológico como *S. mutans*, *C. albicans*, *P. gingivalis*, *T. forsythia* e *T. denticola* são relevantes, objetivando a higienização da cavidade bucal de pacientes internados.

7 CONCLUSÃO

Conclui-se que os extratos vegetais de canela (*C. verum*) e própolis verde (de *B. dracunculifolia*) possuem ação bactericida e antibiofilme contra cepas multirresistentes de *A. baumannii* e *P. aeruginosa* e, quando combinados, há potencialização dos efeitos antimicrobianos. Os extratos combinados foram capazes de inibir a formação de biofilme de *A. baumannii* e *P. aeruginosa* (efeito profilático) de maneira expressiva, com atuação semelhante ao gluconato clorexidina 0,12%. Os produtos vegetais podem ser considerados potenciais agentes antissépticos para futuras formulações odontológicas, visando a profilaxia e controle de infecções nosocomiais causadas por microrganismos multirresistentes que estão presentes na cavidade bucal de pacientes hospitalizados.

REFERÊNCIAS

Abu El-Wafa WM, Ahmed RH, Ramadan MAH. Synergistic effects of pomegranate and rosemary extracts in combination with antibiotics against antibiotic resistance and biofilm formation of *Pseudomonas aeruginosa*. *Braz J Microbiol*. 2020;51(3):1079–92. doi: 10.1007/S42770-020-00284-3.

AL-Kadmy IMS, Ali ANM, Salman IMA, Khazaal SS. Molecular characterization of *Acinetobacter baumannii* isolated from Iraqi hospital environment. *New Microbes New Infect*. 2017;21:51–7. doi: 10.1016/J.NMNI.2017.10.010.

Anjum SI, Ullah A, Khan KA, Attaullah M, Khan H, Ali H, et al. Composition and functional properties of propolis (bee glue): A review. *Saudi J Biol Sci*. 2019;26(7):1695–703. doi: 10.1016/J.SJBS.2018.08.013.

de Azevedo MN, Marques NT, Fonseca MFL, Schuch LF, de Arruda JAA, Santos VR, et al. Disinfectant effects of brazilian green propolis alcohol solutions on the *Staphylococcus aureus* biofilm of maxillofacial prosthesis polymers. *J Prosthet Dent*. 2022;128(6):1405–11. doi: 10.1016/J.PROSDENT.2021.03.025.

Bae IA, Ha JW, Choi JY, Boo YC. Antioxidant effects of korean propolis in HaCaT keratinocytes exposed to particulate matter 10. *Antioxidants (Basel)*. 2022;11(4). doi: 10.3390/ANTIOX11040781.

Barbarossa A, Sblano S, Rosato A, Carrieri A, Corbo F, Clodoveo ML, et al. Synergistic action of *Cinnamomum verum* essential oil with sertraline. *Antibiotics*. 2022;11(11):1617. doi: 10.3390/ANTIBIOTICS11111617.

Bassis CM, Erb-Downward JR, Dickson RP, Freeman CM, Schmidt TM, Young VB, et al. Analysis of the upper respiratory tract microbiotas as the source of the lung and gastric microbiotas in healthy individuals. *MBio*. 2015;6(2). doi: 10.1128/MBIO.00037-15.

Bellissimo-Rodrigues WT, Meneguetti MG, Gaspar GG, Nicolini EA, Auxiliadora-Martins M, Basile-Filho A, et al. Effectiveness of a dental care intervention in the prevention of lower respiratory tract nosocomial infections among intensive care patients: a randomized clinical trial. *Infect Control Hosp Epidemiol*. 2014;35(11):1342–8. doi: 10.1086/678427.

Brackman G, Celen S, Hillaert U, van Calenbergh S, Cos P, Maes L, et al. Structure-activity relationship of cinnamaldehyde analogs as inhibitors of AI-2 based quorum sensing and their effect on virulence of *Vibrio* spp. *PLoS One*. 2011;6(1):e16084. doi: 10.1371/JOURNAL.PONE.0016084.

Caesar LK, Cech NB, Kubanek J, Linington R, Luesch H. Synergy and antagonism in natural product extracts: when 1 + 1 does not equal 2. *Nat Prod Rep*. 2019;36(6):869–88. doi: 10.1039/C9NP00011A.

Ceballos ME, Nuñez C, Uribe J, Vera MM, Castro R, García P, et al. Secondary respiratory early and late infections in mechanically ventilated patients with COVID-19. *BMC Infect Dis.* 2022;22(1). doi: 10.1186/S12879-022-07743-2.

Chapartegui-González I, Lázaro-Díez M, Bravo Z, Navas J, Icardo JM, Ramos-Vivas J. *Acinetobacter baumannii* maintains its virulence after long-time starvation. *PLoS One.* 2018;13(8):e0201961. doi: 10.1371/JOURNAL.PONE.0201961.

Dong J, Li W, Wang Q, Chen J, Zu Y, Zhou X, et al. Relationships between oral microecosystem and respiratory diseases. *Front Mol Biosci.* 2022;8. doi: 10.3389/FMOLB.2021.718222.

Doyle AA, Stephens JC. A review of cinnamaldehyde and its derivatives as antibacterial agents. *Fitoterapia.* 2019;139. doi: 10.1016/J.FITOTE.2019.104405.

Elgamily H, Safy R, Makharita R. Influence of medicinal plant extracts on the growth of oral pathogens *Streptococcus mutans* and *Lactobacillus acidophilus*: an In-vitro study. *Open Access Maced J Med Sci.* 2019;7(14):2328–34. doi: 10.3889/OAMJMS.2019.653.

El-Guendouz S, Aazza S, Lyoussi B, Bankova V, Popova M, Neto L, et al. Moroccan propolis: a natural antioxidant, antibacterial, and antibiofilm against *Staphylococcus aureus* with no induction of resistance after continuous exposure. *Evid Based Complement Alternat Med.* 2018;2018. Article ID 9759240. doi:10.1155/2018/9759240.

Gaber SN, Hemeda EEM, Elsayeh HAS, Abdel Wahed WY, Khalil MAF, Ibrahim EG. Propolis extract: a possible antiseptic oral care against multidrug-resistant non-fermenting bacteria isolated from non-ventilator hospital-acquired pneumonia. *J Pure Appl Microbiol.* 2020;14(1):123–31. doi: 10.22207/JPAM.14.1.13.

Ganić T, Vuletić S, Nikolić B, Stevanović M, Kuzmanović M, Kekić D, et al. Cinnamon essential oil and its emulsion as efficient antibiofilm agents to combat *Acinetobacter baumannii*. *Front Microbiol.* 2022;13. doi: 10.3389/FMICB.2022.989667.

Greene C, Wu J, Rickard AH, Xi C. Evaluation of the ability of *Acinetobacter baumannii* to form biofilms on six different biomedical relevant surfaces. *Lett Appl Microbiol.* 2016;63(4):233–9. doi: 10.1111/LAM.12627.

Hata T, Tazawa S, Ohta S, Rhyu M-R, Misaka T, Ichihara K. Artepillin C, a major ingredient of brazilian propolis, induces a pungent taste by activating TRPA1 *PLoS One* 2012;7(11):e48072. doi: 10.1371/journal.pone.0048072.

Hu S, You Y, Zhang S, Tang J, Chen C, Wen W, et al. Multidrug-resistant infection in COVID-19 patients: A meta-analysis. *J Infect.* 2023;86(1):66–117. doi: 10.1016/J.JINF.2022.10.043.

Ibrahim S, Al-Saryi N, Al-Kadmy IMS, Aziz SN. Multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* as an emerging concern in hospitals. *Mol Biol Rep*. 2021;48(10):6987. doi: 10.1007/S11033-021-06690-6.

Intorasoot A, Chornchoem P, Sookkhee S, Intorasoot S. Bactericidal activity of herbal volatile oil extracts against multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii*. *J Intercult Ethnopharmacol*. 2017;6(2):218–22. doi: 10.5455/JICE.20170411091159.

Jaktaji RP, Ghalamfarsa F. Antibacterial activity of honeys and potential synergism of honeys with antibiotics and alkaloid extract of *Sophora alopecuroides* plant against antibiotic-resistant *Escherichia coli* mutant. *Iran J Basic Med Sci*. 2021;24(5):623. doi: 10.22038/IJBMS.2021.54224.12179.

Jayaprakasha GK, Rao LJM. Chemistry, biogenesis, and biological activities of *Cinnamomum zeylanicum*. *Crit Rev Food Sci Nutr*. 2011;51(6):547–62. doi: 10.1080/10408391003699550.

Jurado-Martín I, Sainz-Mejías M, McClean S. *Pseudomonas aeruginosa*: an audacious pathogen with an adaptable arsenal of virulence factors. *Int J Mol Sci*. 2021;22(6):1–37. doi: 10.3390/IJMS22063128.

Kalia M, Yadav VK, Singh PK, Sharma D, Pandey H, Narvi SS, et al. Effect of cinnamon oil on quorum sensing-controlled virulence factors and biofilm formation in *Pseudomonas aeruginosa*. *PLoS One*. 2015;10(8). doi: 10.1371/JOURNAL.PONE.0135495.

Kawatra P, Rajagopalan R. Cinnamon: Mystic powers of a minute ingredient. *Pharmacognosy Res*. 2015;7(Suppl 1):S1–6. doi: 10.4103/0974-8490.157990.

Kim NY, Kim S, Park HM, Lim CM, Kim J, Park JY, et al. *Cinnamomum verum* extract inhibits NOX2/ROS and PKC δ /JNK/AP-1/NF- κ B pathway-mediated inflammatory response in PMA-stimulated THP-1 monocytes. *Phytomedicine*. 2023;112. doi: 10.1016/J.PHYMED.2023.154685.

Kostakioti M, Hadjifrangiskou M, Hultgren SJ. Bacterial biofilms: development, dispersal, and therapeutic strategies in the dawn of the postantibiotic era. *Cold Spring Harb Perspect Med*. 2013;3(4). doi: 10.1101/CSHPERSPECT.A010306.

LeBel G, Haas B, Adam AA, Veilleux MP, Lagha A Ben, Grenier D. Effect of cinnamon (*Cinnamomum verum*) bark essential oil on the halitosis-associated bacterium *Solobacterium moorei* and in vitro cytotoxicity. *Arch Oral Biol*. 2017;83:97–104. doi: 10.1016/J.ARCHORALBIO.2017.07.005.

Livermore DM. Multiple mechanisms of antimicrobial resistance in *Pseudomonas aeruginosa*: our worst nightmare? *Clin Infect Dis*. 2002;34(5):634–40. doi: 10.1086/338782.

De Lucena Rangel M, De Aquino SG, De Lima JM, Castellano LR, De Castro RD. In vitro effect of *cinnamomum zeylanicum* blume essential oil on *Candida* spp. involved

in oral infections. *Evid Based Complement Alternat Med*. 2018;2018. Article ID 4045013. doi: 10.1155/2018/4045013.

Machado BAS, Silva RPD, Barreto GDA, Costa SS, Da Silva DF, Brandão HN, et al. Chemical composition and biological activity of extracts obtained by supercritical extraction and ethanolic extraction of brown, green and red propolis derived from different geographic regions in Brazil. *PLoS One*. 2016;11(1). doi: 10.1371/JOURNAL.PONE.0145954.

Mea HJ, Yong PVC, Wong EH. An overview of *Acinetobacter baumannii* pathogenesis: Motility, adherence and biofilm formation. *Microbiol Res*. 2021;247. doi: 10.1016/J.MICRES.2021.126722.

Meto Aida, Colombari B, Meto Agron, Boaretto G, Pinetti D, Marchetti L, et al. Propolis affects *Pseudomonas aeruginosa* growth, biofilm formation, eDNA release and phenazine production: potential involvement of polyphenols. *Microorganisms*. 2020;8(2): 243. doi: <https://doi.org/10.3390/microorganisms8020243>

Moise AR, Bobiş O. *Baccharis dracunculifolia* and *dalbergia ecastophyllum*, main plant sources for bioactive properties in green and red brazilian propolis. *Plants (Basel)*. 2020;9(11):1–23. doi: 10.3390/PLANTS9111619.

Moshrefi A. Chlorhexidine. *J West Soc Periodontol Abstr*. 2002;50(1):5–9.

Panchal V, Gurunathan D, Muralidharan N. Comparison of antibacterial efficacy of cinnamon extract, neem extract as irrigant and sodium hypochlorite against *Enterococcus fecalis*: An in vitro study. *Indian J Dent Res*. 2020;31(1):124–8. doi: 10.4103/IJDR.IJDR_177_18.

Pragman AA, Lyu T, Baller JA, Gould TJ, Kelly RF, Reilly CS, et al. The lung tissue microbiota of mild and moderate chronic obstructive pulmonary disease. *Microbiome*. 2018;6, (7). doi: 10.1186/S40168-017-0381-4.

Przybyłek I, Karpiński TM. Antibacterial properties of propolis. *Molecules*. 2019;24(11):2047. <https://doi.org/10.3390/molecules24112047>

Ramata-Stunda A, Petrina Z, Valkovska V, Boroduškis M, Gibnere L, Gurkovska E, et al. Synergistic effect of polyphenol-rich complex of plant and green propolis extracts with antibiotics against respiratory infections causing bacteria. *Antibiotics* 2022;11(2):160. doi: 10.3390/ANTIBIOTICS11020160.

Riad A, Gomaa E, Hockova B, Klugar M. Oral candidiasis of COVID-19 patients: case report and review of evidence. *J Cosmet Dermatol*. 2021;20(6):1580–4. doi: 10.1111/JOCD.14066.

de Sá Assis MA, de Paula Ramos L, Abu Hasna A, de Queiroz TS, Pereira TC, Nagai de Lima PM, et al. Antimicrobial and antibiofilm effect of brazilian green propolis aqueous extract against dental anaerobic bacteria. *Molecules*. 2022;27(23):8128. doi: 10.3390/MOLECULES27238128.

- Santos PB do RE dos, Ávila D da S, Ramos L de P, Yu AR, Santos CE da R, Berretta AA, et al. Effects of brazilian green propolis extract on planktonic cells and biofilms of multidrug-resistant strains of *Klebsiella pneumoniae* and *Pseudomonas aeruginosa*. *Biofouling* 2020;36(7):834–45. doi: 10.1080/08927014.2020.1823972.
- Saqib SA, Alqahtani NA, Ahmad I, Kader MA, Al Shahrani SS, Asiri EA. Evaluation and comparison of antibacterial efficacy of herbal extracts in combination with antibiotics on periodontal pathobionts: an in vitro microbiological study. *Antibiotics*. 2019;8(3):89. doi: 10.3390/ANTIBIOTICS8030089.
- Sharma G, Rao S, Bansal A, Dang S, Gupta S, Gabrani R. *Pseudomonas aeruginosa* biofilm: potential therapeutic targets. *Biologicals*. 2014;42(1):1–7. doi: 10.1016/J.BIOLOGICALS.2013.11.001.
- Silva RPD, Machado BAS, Barreto G de A, Costa SS, Andrade LN, Amaral RG, et al. Antioxidant, antimicrobial, antiparasitic, and cytotoxic properties of various brazilian propolis extracts. *PLoS One*. 2017;12(3):e0172585. doi: 10.1371/JOURNAL.PONE.0172585.
- Sumi Y, Miura H, Michiwaki Y, Nagaosa S, Nagaya M. Colonization of dental plaque by respiratory pathogens in dependent elderly. *Arch Gerontol Geriatr*. 2007;44(2):119–24. doi: 10.1016/J.ARCHGER.2006.04.004.
- Šuran J, Cepanec I, Mašek T, Starčević K, Gajger IT, Vranješ M, et al. Nonaqueous polyethylene glycol as a safer alternative to ethanolic propolis extracts with comparable antioxidant and antimicrobial activity. *Antioxidants (Basel)*. 2021;10(6). doi: 10.3390/ANTIOX10060978.
- Tenover FC, Nicolau DP, Gill CM. Carbapenemase-producing *Pseudomonas aeruginosa* -an emerging challenge. *Emerg Microbes Infect*. 2022;11(1):811–4. doi: 10.1080/22221751.2022.2048972.
- Tetard A, Gaillot S, Dubois E, Aarras S, Valot B, Phan G, et al. Exposure of *Pseudomonas aeruginosa* to cinnamaldehyde selects multidrug resistant mutants. *Antibiotics (Basel)*. 2022;11(12). doi: 10.3390/ANTIBIOTICS11121790.
- Thi MTT, Wibowo D, Rehm BHA. *Pseudomonas aeruginosa* Biofilms. *Int J Mol Sci*. 2020;21(22):1–25. doi: 10.3390/IJMS21228671.
- Topa SH, Subramoni S, Palombo EA, Kingshott P, Rice SA, Blackall LL. Cinnamaldehyde disrupts biofilm formation and swarming motility of *Pseudomonas aeruginosa*. *Microbiology (Reading)*. 2018;164(9):1087–97. doi: 10.1099/MIC.0.000692.
- Vasconcelos NG, Croda J, Simionatto S. Antibacterial mechanisms of cinnamon and its constituents: A review. *Microb Pathog*. 2018;120:198–203. doi: 10.1016/J.MICPATH.2018.04.036.

Weiner-Lastinger LM, Abner S, Edwards JR, Kallen AJ, Karlsson M, Magill SS, et al. Antimicrobial-resistant pathogens associated with adult healthcare-associated infections: Summary of data reported to the National Healthcare Safety Network, 2015-2017. *Infect Control Hosp Epidemiol*. 2020;41(1):1–18. doi: 10.1017/ICE.2019.296.

Whiteway C, Breine A, Philippe C, Van der Henst C. *Acinetobacter baumannii*. *Trends Microbiol*. 2022;30(2):199–200. doi: 10.1016/J.TIM.2021.11.008.

World Health Organization (WHO) [Internet]. Prioritization of pathogens to guide discovery, research and development of new antibiotics for drug-resistant bacterial infections, including tuberculosis. Geneva, World Health Organization [cited 2023 Mar 16]. Available from: <https://www.who.int/publications/i/item/WHO-EMP-IAU-2017.12>

Wijesinghe GK, de Oliveira TR, Maia FC, de Feiria SB, Barbosa JP, Joia F, et al. Efficacy of true cinnamon (*Cinnamomum verum*) leaf essential oil as a therapeutic alternative for *Candida* biofilm infections. *Iran J Basic Med Sci*. 2021;24(6):787. doi: 10.22038/IJBMS.2021.53981.12138.

Yanakiev S. Effects of Cinnamon (*Cinnamomum* spp.) in dentistry: a review. *Molecules*. 2020;25(18). doi: 10.3390/MOLECULES25184184.

Zarei Yazdeli M, Ghazaei C, Tasallot Maraghi E, Bakhshi A, Shukohifar M. Evaluation of antibacterial synergism of methanolic extract of *dracocephalum kotschyi* and *trachyspermum ammi*. *Malays J Med Sci*. 2021;28(6):64. doi: 10.21315/MJMS2021.28.6.7.