



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

DAMARA DA SILVA ÁVILA

**AÇÃO CITOTÓXICA E ANTIMICROBIANA DO EXTRATO
GLICÓLICO DE *Zingiber officinale* SOBRE MICRO-
ORGANISMOS DE INTERESSE PARA ODONTOLOGIA**

2019

DAMARA DA SILVA ÁVILA

**AÇÃO CITOTÓXICA E ANTIMICROBIANA DO EXTRATO
GLICÓLICO DE *Zingiber officinale* SOBRE MICRO-ORGANISMOS DE
INTERESSE PARA ODONTOLOGIA**

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

Área de Microbiologia e Imunologia. Linha de Pesquisa: Doenças infecciosas de interesse médico-odontológico.

Orientador: Prof. Tit. Antonio Olavo Cardoso Jorge

São José dos Campos

2019

BANCA EXAMINADORA

Prof. Tit. Antonio Olavo Cardoso Jorge (Orientador)

Universidade Estadual Paulista (Unesp)

Instituto de Ciência e Tecnologia

Campus de São José dos Campos

Profa. Ass. Luciane Dias de Oliveira

Universidade Estadual Paulista (Unesp)

Instituto de Ciência e Tecnologia

Campus de São José dos Campos

Profa. Dra. Cristiane Aparecida Pereira

Instituto Taubaté de Ensino Superior

Campus de Taubaté

São José dos Campos, 29 de abril de 2019.

DEDICATÓRIA

Ao meu filho Gael, que me ensina todos os dias a ver a vida com mais simplicidade e alegria, a valorizar o que realmente importa e a amar incondicionalmente.

À minha família, pela companhia nos momentos felizes, pela paciência nos momentos difíceis e pelo amor em todos eles.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente à Deus, pela minha vida e por me dar forças para realizar meus sonhos.

Aos professores que dedicaram um pouco de si para que eu pudesse obter o título de mestre.

Ao Prof. Tit. Antonio Olavo Cardoso Jorge, que a seis anos atrás acreditou em mim e me iniciou na pesquisa, por todo suporte que sempre me foi dado com muito carinho e disposição, não tenho palavras suficientes para agradecê-lo.

À Prof^a Ass. Luciane Dias de Oliveira, por todo conhecimento que dividiu comigo, e principalmente quando me guiou para que eu seguisse sozinha, com muita paciência e carinho.

À Prof^a Dr^a Fernanda Freire que me apresentou o mundo acadêmico, você sempre será um exemplo de profissional e pessoal para mim.

À todos os amigos que fiz pelo caminho, Nádia, Kaike, Aline, Daphne, Maíra, Lucas e muitos outros que estiveram ao meu

lado. Em especial à Pâmela, que fez meus dias mais alegres no laboratório e dividiu comigo as angustias do dia-a-dia.

Aos técnicos e funcionários que possibilitaram um ambiente agradável para trabalhar.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pela concessão da Bolsa de Mestrado no período de 01/01/2017 a 29/04/2019.

À minha irmã querida, que me auxiliou desde a parte técnica a emocional, sempre dispondo do seu tempo e seu amor para conosco; à minha mãe, que cuidou do seu neto com tanto carinho que só uma avó teria; ao meu pai e irmão pela paciência e apoio; vocês são a minha base.

Ao meu marido e ao meu filho pela minha família, por me ensinarem tanto todos os dias, por estarem ao meu lado, por toda ajuda, amo vocês.

À todos que direta ou indiretamente fizeram parte da minha formação, o meu muito obrigada.

*“Somente se aproxima da perfeição quem a procura com constância, sabedoria,
e sobretudo humildade”*

Jigoro Kano

SUMÁRIO

RESUMO	9
ABSTRACT	10
1 INTRODUÇÃO	11
2 PROPOSIÇÃO	15
2.1 Objetivo geral	15
2.2 Objetivos específicos	15
3 MATERIAL E MÉTODOS.....	17
3.1 Avaliação da atividade antimicrobiana.....	17
3.1.1 Determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM) e Concentração Microbicida Mínima (CMM)	17
3.1.2 Avaliação da atividade antimicrobiana sobre biofilmes.....	20
3.2 Avaliação da citotoxicidade do extrato em cultura celular.....	23
3.3 Análise estatística	25
4 RESULTADOS	26
4.1 Atividade antimicrobiana	26
4.1.1 Concentração Inibitória Mínima (CIM) e Concentração Microbicida Mínima (CMM)	26
4.1.2 Biofilmes monotípicos	27
4.1.3 Biofilmes heterotípicos.....	34
4.2 Citotoxicidade do extrato em cultura celular	38
5 DISCUSSÃO	40
6 CONCLUSÃO	46
REFERÊNCIAS	47
ANEXO.....	51

Avila DS. Ação citotóxica e antimicrobiana do extrato glicólico de *Zingiber officinale* sobre micro-organismos de interesse para odontologia. São José dos Campos (SP): Universidade Estadual Paulista (Unesp), Instituto de Ciência e Tecnologia; 2019.

RESUMO

O número de espécies bacterianas resistentes aos antimicrobianos tem atingido níveis elevados. Com isso, torna-se necessária a realização de pesquisas que avaliem os efeitos de métodos terapêuticos alternativos. Os objetivos desse trabalho foram avaliar a citotoxicidade do extrato glicólico de *Zingiber officinale* em macrófagos de camundongos e queratinócitos humanos, atividade antimicrobiana sobre biofilmes monotípicos (micro-organismos aeróbios: *Candida albicans*, *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus mutans*, *Pseudomonas aeruginosa*, e anaeróbios: *Porphyromonas gingivalis*, *Porphyromonas endodontalis*, *Prevotella intermedia*) e biofilmes heterotípicos (associação: *C. albicans* e bactérias aeróbias). Para ação citotóxica, as células foram cultivadas em meio DMEM, semeadas (2×10^4 células/poço) na placa de 96 poços. Após aderência inicial, foi adicionado o extrato em diluição seriada (5 min e 24 h), e realizado o teste de MTT. Para avaliar a ação antimicrobiana, a Concentração Inibitória Mínima (CIM) e Concentração Microbicida Mínima (CMM) foram determinadas segundo as normas do CLSI. Para biofilmes, foram adicionados 100 µL meio de cultura e 100 µL suspensão microbiana (10^7 UFC/mL) em placas de 96 poços, nos heterotípicos foram utilizados 50 µL de cada micro-organismo. As placas foram incubadas (37°C), por 48 h (aeróbios) ou por 7 dias (anaeróbios). Aplicou-se o extrato (5 min e 24 h), nas concentrações efetivas pré-determinadas (CMM) e duas superiores, depois os biofilmes foram desagregados e semeados para a contagem de UFC. Os dados foram analisados estatisticamente (ANOVA e Tukey, ou Kruskal-Wallis e Dunn, 5%). O extrato glicólico de *Z. officinale* apresentou viabilidade celular superior a 50% a partir de 50 (5 min) e 6,25 mg/mL (24 h) aos macrófagos, 25 (5 min) e 12,5 mg/mL (24 h) aos queratinócitos. Nos biofilmes monotípicos apresentou resultados mais significantes sobre *C. albicans*, *P. endodontalis* e *P. intermedia*. Mostrou-se mais efetivo sobre os biofilmes heterotípicos, como na associação entre *C. albicans* e *S. aureus* (24 h) onde apresentou redução de 90% e 100%, respectivamente. Conclui-se que o extrato glicólico de *Z. officinale* apresentou viabilidade celular superior a 50% na cultura de macrófagos e queratinócitos, apresentou atividade antimicrobiana sobre os biofilmes monotípicos de *C. albicans*, *S. aureus*, *S. mutans*, *P. gingivalis*, *P. endodontalis*, *P. intermedia* e sobre os biofilmes heterotípicos.

Palavras-chave: Gengibre. Antifúngicos. Antibacterianos. Toxicidade.

Avila DS. Cytotoxic action and antimicrobial of Zingiber officinale glycolic extract of microorganisms of interest for dentistry. São José dos Campos (SP). São Paulo State University (Unesp), Institute of Science and Technology; 2019.

ABSTRACT

The number of bacterial species resistant to antimicrobials has reached high levels. Thus, it is necessary to perform research that evaluates the alternative therapeutic methods, such as ginger. The present study was to evaluate the cytotoxicity of the Zingiber officinale glycolic extract in human and mouse macrophages, antimicrobial activity on monotypic biofilms (aerobic microorganisms: Candida albicans, Staphylococcus aureus, Streptococcus mutans, Pseudomonas aeruginosa, and anaerobes: Porphyromonas gingivalis, Porphyromonas endodontalis, Prevotella intermedia) and heterotypic biofilms (association: C. albicans and aerobic bacteria). To cytotoxic action, the cells have been cultivated in DMEM medium, seeded (2×10^4 cells/well) in the 96-well plate. After initial adhesion, the extract has been added to serial dilution (5 min and 24 h), and the MTT tests were performed. In order to assess the antimicrobial action, Minimal Inhibitory Concentration (MIC) and Minimum Microbicidal Concentration (MMC) were determined in according to CLSI standards. In the biofilms case, 100 μ L culture medium and 100 μ L microbial suspension (10^7 CFU / mL) were added to 96-well plates, 50 μ L of each microorganism was used in the heterotypics. The plates were incubated (37°C) for 48 h period (aerobic) or for 7 days (anaerobic). The extract (5 min and 24 h) was applied at the pre-determined effective concentrations (MMC) and two higher concentrations, after which the biofilms were disaggregated and seeded for the CFU count. Data were analyzed statistically (ANOVA and Tukey, or Kruskal-Wallis and Dunn, 5%). The glycolic extract of Z. officinale presented cell viability greater than 50% from 50 (5 min) and 6.25 mg/mL (24 h) to macrophages, 25 (5 min) and 12.5 mg/mL (24 h) to keratinocytes. In the monotypic biofilms presented significant results on C. albicans, P. endodontalis and P. intermedia. It was shown to be more effective on heterotypic biofilms, as well as in the association between C. albicans and S. aureus (24 h), where it is presented a reduction of 90% and 100%, respectively. It concluded that Z. officinale glycolic extract presented cell viability greater than 50% in the macrophages and keratinocytes culture, in which presented antimicrobial activity on the monotypic biofilms of C. albicans, S. aureus, S. mutans, P. gingivalis, P. endodontalis, P. intermedia and on heterotypic biofilms.

Keywords: Ginger. Antifungal Agents. Anti-Bacterial. Toxicity.

1 INTRODUÇÃO

Devido ao uso indiscriminado de fármacos, os micro-organismo têm se tornado cada vez mais resistentes aos antimicrobianos convencionais. A adaptação de bactérias, fungos e vírus aos fármacos, desenvolvendo mecanismos de resistência e sobrevivendo na presença de antimicrobianos, tem aumentado às taxas de mortalidade e morbidade da população (World Health Organization, 2015; Burnham et al., 2017).

Os micro-organismos na cavidade bucal também estão cada vez mais resistentes aos antimicrobianos, como: cepas de *Staphylococcus aureus* resistentes a meticilina e vancomicina, assim como espécies de *Candida* resistentes aos azóis, e também cepas de *Pseudomonas aeruginosa* super-resistentes, que têm sido um grande desafio, principalmente em hospitais. Além do aumento da resistência, aumenta também a virulência desses micro-organismos, gerando, doenças cada vez mais difíceis de serem tratadas (Chung et al., 2014; Whaley et al., 2017; Chakotiya et al., 2017). Por esse motivo, torna-se necessária a realização de novas pesquisas que possibilitem novos métodos terapêuticos e avaliem seus efeitos, como o uso de fitoterápicos.

Os fitoterápicos são medicamentos derivados de plantas medicinais, utilizados popularmente, seus riscos e sua eficácia são conhecidos e devidamente regulamentados, e deve-se ter a mesma atenção e cuidados iguais aos demais medicamentos (Agência Nacional de Vigilância Sanitária, 2018), entretanto, é extremamente importante a realização de novas pesquisas que avaliem seus efeitos terapêuticos.

Zingiber officinale, popularmente conhecido como gengibre, é uma planta utilizada amplamente pela população, bastante procurado para tratamento de gripes e resfriados. Pela cultura popular sabe-se que ele possui ação

hiperemiante, estimula a circulação periférica e ação anti-inflamatória. Porém, são necessários novos estudos que avaliem sua toxicidade e sua atividade antimicrobiana, pois apesar de ser um extrato natural, seu uso indevido e doses excessivas podem causar efeitos tóxicos e prejudiciais à saúde (D'Souza et al., 2017).

Alguns estudos são encontrados na literatura, utilizando o *Z. officinale*. Mahyari et al. (2016) em uma pesquisa clínica, elaboraram um enxaguatório bucal poli-herbal (extratos alcoólicos de: *Z. officinale*, *Rosmarinus officinalis* e *Calendula officinalis*), para combater a gengivite. Os autores observaram que o enxaguatório com os fitoterápicos foi tão eficaz quanto o enxaguatório de clorexidina (0,2%), portanto, consideraram o produto como excelente antimicrobiano no tratamento da gengivite. Os autores não realizaram porém, análise específica para identificar ou quantificar a microbiota.

Z. officinale já foi utilizado para diminuir a formação do biofilme de cepas de *Klebsiella* spp., sendo eficaz para o tratamento de infecções por estas bactérias (Avcioglu et al., 2016). Chakotiya et al. (2017) também verificaram a ação antibacteriana do extrato hidroalcoólico de *Z. officinale*, sobre a formação do biofilme e sobre culturas planctônicas de *P. aeruginosa* super-resistentes. Os autores observaram que o mesmo foi eficaz na inibição do crescimento da bactéria e formação do biofilme.

Estudos avaliaram a atividade antimicrobiana e antibiofilme, sobre cepas de *S. aureus*, *Candida albicans*, e outros micro-organismos. Aghazadeh et al. (2016) concluíram que o extrato etanólico de *Z. officinale* possui boa ação antimicrobiana, assim como Barman e Jha (2013) comprovaram a eficácia do óleo essencial de *Z. officinale*. Sharifzadeh e Shokri (2016) avaliaram a atividade antifúngica de óleos essenciais, entre eles o *Z. officinale*, sobre espécies de *C. albicans* resistentes e susceptíveis ao fluconazol, tendo como resultado boa atividade antifúngica do óleo essencial de *Z. officinale*, tanto sobre

os fungos susceptíveis quanto os resistentes ao fluconazol.

Valera et al. (2014) realizaram um estudo *in vitro* onde canais radiculares de dentes extraídos foram previamente contaminados com *Enterococcus faecalis*, *C. albicans* e *Escherichia coli*. Os autores testaram o extrato glicólico de *Z. officinale* como medicação intracanal, separadamente ou associado com hidróxido de cálcio, obtiveram como resultado, a redução do número de micro-organismos nos canais radiculares, em ambos os testes. Em estudo mais recente, Valera et al. (2016), utilizaram os mesmos grupos de medicação intracanal (extrato glicólico de *Z. officinale* associado ou não ao hidróxido de cálcio), porém nesse estudo, antes da utilização da medicação intracanal foi feita a instrumentação dos canais radiculares com clorexidina 0,2%. *C. albicans* e *E. coli* foram eliminados na instrumentação, porém *E. faecalis* teve sua completa eliminação apenas depois da utilização da medicação intracanal (sem diferença estatística entre os grupos).

Maekawa et al. (2015) avaliaram se diferentes extratos (seco, fresco e glicólico) de *Z. officinale* eram capazes de auxiliar na sobrevivência de *Galleria mellonella* infectadas por *E. faecalis*, esse estudo *in vivo* observou que os extrato glicólico de *Z. officinale* aumentou a sobrevivência de *G. mellonella* em 50% quando comparada ao grupo controle, onde se tem apenas a infecção por *E. faecalis*.

Park et al. (2008) verificaram que o extrato etanólico e n-hexano de *Z. officinale* possuem efeito antibacteriano sobre bactérias anaeróbias Gram-negativas, de interesse odontológico, encontradas na doença periodontal, *Porphyromonas gingivalis*, *Porphyromonas endodontalis* e *Prevotella intermedia*, no entanto, as pesquisas que envolvem micro-organismos anaeróbios ainda são escassas, principalmente relacionadas aos diferentes extratos de *Z. officinale*, de modo que novos estudos são importantes para promover correta indicação terapêutica com relação à dose eficaz e segura.

De acordo com a literatura, o *Z. officinale* tem demonstrado ação antimicrobiana sobre diferentes micro-organismos mas a maioria dos estudos utiliza óleos essenciais ou extratos à base de álcool, o que pode sugerir um efeito do solvente por si só, e isso pode ser uma desvantagem, como por exemplo em um enxaguatório bucal ele não tem indicação, por ser o álcool agressivo às mucosas (D' Souza et al., 2017). Por isso, é importante a realização de novas pesquisas que não utilizem o álcool como solvente, como por exemplo, os extratos glicólicos, que utilizam propilenoglicol.

Ainda é necessária a realização de estudos que avaliem a atividade antimicrobiana do extrato glicólico de *Z. officinale* que abranja maior número de micro-organismos, como os de interesse odontológico e principalmente as bactérias anaeróbias, pouco relatadas na literatura. E também, avaliem a sua citotoxicidade, de extrema importância, e pouco estudado até o momento.

2 PROPOSIÇÃO

2.1 Objetivo geral

Avaliar a citotoxicidade e os efeitos antimicrobianos do extrato glicólico de *Zingiber officinale* sobre micro-organismos aeróbios e anaeróbios de interesse odontológico.

2.2 Objetivos específicos

- a) avaliar a citotoxicidade do extrato glicólico de *Z. officinale* sobre as duas linhagens celulares (macrófagos de camundongo RAW 264.7 e queratinócitos humanos HaCaT, nos tempos de contato de 5 min e 24 h.
- b) avaliar a atividade antimicrobiana do extrato glicólico de *Z. officinale* sobre os micro-organismos: *Candida albicans*, *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus mutans*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Porphyromonas gingivalis*, *Porphyromonas endodontalis* e *Prevotella intermedia*, determinando a concentração inibitória mínima (CIM) e concentração microbicida mínima (CMM) em cultura planctônica;
- c) avaliar a atividade antimicrobiana do extrato glicólico de *Z. officinale* sobre biofilmes monotípicos dos micro-organismos acima citados, no tempo de contato de 5 min e 24 h;

- d) avaliar a atividade antimicrobiana do extrato glicólico de *Z. officinale* sobre biofilmes multiespécies de *C. albicans* com *S. aureus*, *C. albicans* com *S. mutans* e *C. albicans* com *P. aeruginosa*, nos tempos de 5 min e 24 h;

3 MATERIAL E MÉTODOS

Foi utilizado extrato glicólico de *Zingiber officinale* R., cuja concentração no propilenoglicol foi de 20%, obtido a partir do rizoma da planta. O extrato foi fornecido pela empresa Mapric (São Paulo, SP) com devidos laudos e especificações (ANEXO A).

3.1 Avaliação da atividade antimicrobiana

Para a avaliação da atividade antimicrobiana foram utilizadas cepas de referência (ATCC - *American Type Culture Collection*) de *Candida albicans* (ATCC 18804), *Staphylococcus aureus* (ATCC 6538), *Streptococcus mutans* (ATCC 35688), e *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 15442), provenientes do Laboratório de Microbiologia e Imunologia do Curso de Odontologia do ICT - Unesp. Foram utilizadas também cepas-padrão de bactérias anaeróbias: *Porphyromonas gingivalis* (ATCC 33277), *Porphyromonas endodontalis* (ATCC 35406) e *Prevotella intermedia* (ATCC 33563), provenientes do Laboratório de Endodontia da Faculdade de Odontologia de Bauru - USP.

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

A CIM e a CMM foram determinadas utilizando o método de

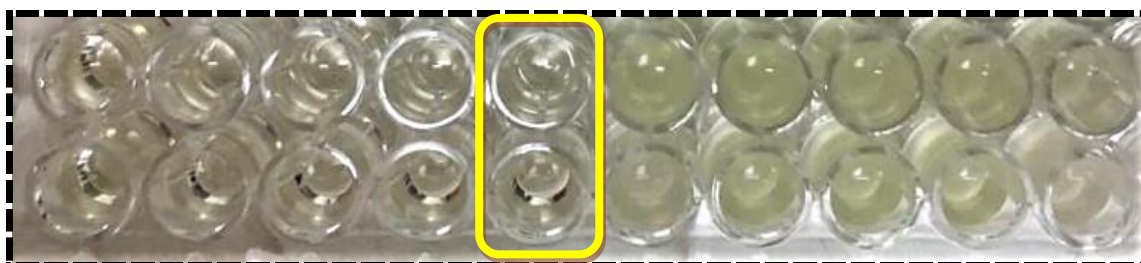
microdiluição em caldo, segundo *Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI)*, normas M7-A6 e M27-A2.

Os micro-organismos foram isolados e cultivados por 24 h em estufa bacteriológica (37°C, com 5% de CO₂ para *S. mutans*), a seguir, os inóculos foram padronizados em solução fisiológica estéril (NaCl 0,9%), em espectrofotômetro (10⁶ UFC/mL) para os micro-organismos aeróbios e na escala 0,5 MacFarland para as bactérias anaeróbias, sendo essas incubadas em câmara de anaerobiose (Whitley DG250 Workstation) (5% H₂, 10% CO₂ e 85% N₂), seguindo as recomendações da *NCCLS* (2002, 2003).

O teste de microdiluição foi realizado em placas de 96 poços, onde foram adicionados 100 µL de meio de cultura, 100 µL dos extratos, apenas no primeiro poço da microplaca, a partir desse poço foi realizada uma série de 10 diluições. Acrescentou-se 100 µL dos inóculos padronizados (Figura 1). Os meios utilizados foram caldo Brucella (suplementado com 5% de sangue lisado, 1% de hemina e 1% de menadiona) para as bactérias anaeróbias. Caldo Mueller Hinton (Himedia) para as demais bactérias, e meio RPMI 1640 (com glutamina, sem bicarbonato e com indicador vermelho de fenol) (Himedia) tamponado com MOPS [ácido 3-(N-morfolino) propanosulfônico] (Sigma-Aldrich) pH 7,0 ± 0,1, para as leveduras. As placas foram incubadas por 24 h, e a CIM foi determinada pelo último poço que não apresentou turvações (Figura 1), isso indica que não houve crescimento microbiano.

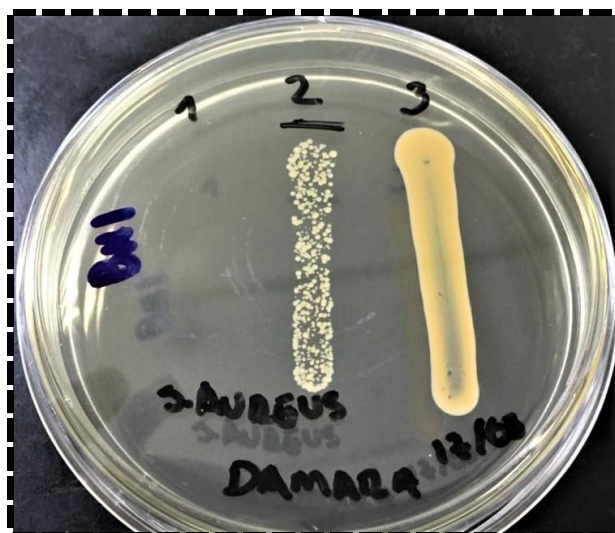
A CMM do extrato foi determinada fazendo-se a semeadura de 10 µL da CIM, assim como de uma concentração acima e uma abaixo, em ágar Brucella enriquecido com sangue para bactérias anaeróbias, ágar Brain Heart Infusion (BHI - Himedia) para as demais bactérias e Sabouraud-dextrose (Himedia) para levedura. Essas placas foram incubadas por 48 h, e onde não foi observado crescimento de colônias foi determinada a CMM do extrato para cada micro-organismo (Figura 2).

Figura 1- Teste de microdiluição em caldo do extrato glicólico de *Zingiber officinale* e Concentração Inibitória Mínima (CIM) identificada no último poço que não apresentou turvação



Fonte: Elaborada pelo autor.

Figura 2- Semeadura em Ágar da Concentração Inibitória Mínima (CIM), uma concentração abaixo e uma superior para determinação da Concentração Microbicida Mínima (CMM) identificada onde não houve crescimento microbiano



Fonte: Elaborada pelo autor.

3.1.2 Avaliação da atividade antimicrobiana sobre biofilmes

Foi avaliado o efeito antimicrobiano do extrato de *Z. officinale* sobre biofilmes monotípicos de *C. albicans*, *S. aureus*, *S. mutans*, *P. aeruginosa*, *P. gingivalis*, *P. endodontalis* e *P. intermedia*. Assim como biofilmes heterotípicos de *C. albicans* com *S. aureus*, *C. albicans* com *S. mutans* e *C. albicans* com *P. aeruginosa*.

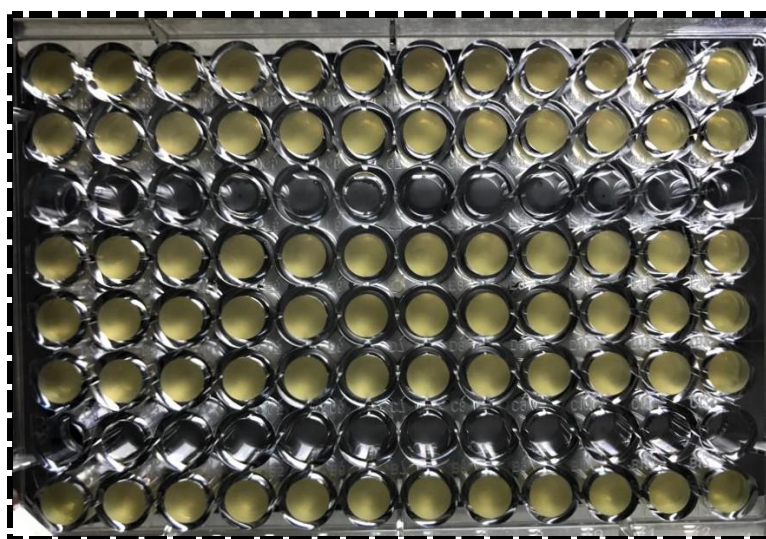
Foram adicionados em placas de microtitulação de 96 poços (TPP) 100 µL de meio de cultura, 100 µL das suspensões microbianas (para os biofilmes heterotípicos foram utilizados 50 µL de cada micro-organismo) padronizadas em espectrofotômetro (Micronal B-582, São Paulo, Brasil) a 10^7 UFC/mL em solução fisiológica (NaCl 0,9%) ou 0,5% na escala MacFarland para as bactérias anaeróbias. Em seguida, a placa foi incubada (37°C) sob agitação (75 rpm) por 90 min. Após esse período de aderência inicial, o sobrenadante é descartado e adicionado meio de cultura, sendo Yeast Nitrogen Base (YNB – Sigma-Aldrich) para *C. albicans*, caldo Brucella suplementado para as bactérias anaeróbias e caldo BHI (Himedia) para as demais bactérias e nos biofilmes heterotípicos. As placas foram incubadas por 48 h, com substituição do meio de cultura após 24 h, para os micro-organismos aeróbios e 7 dias para os anaeróbios, com troca do caldo de 48 em 48 h (Figura 3).

Depois da formação, os biofilmes, foram colocados em contato com o extrato, por dois períodos de tempo diferentes: 5 min e 24 h, nas concentrações efetivas pré-determinadas (CMM) e duas superiores. Como controle positivo foi utilizada a clorexidina 0,12% (Periogard). Solução salina estéril foi utilizada como controle negativo em tratamentos de 5 min e os meios de cultura, respectivos de cada micro-organismo, foram utilizados nos tratamentos de 24 h (Figura 4).

Depois disso, estas soluções foram descartadas, o biofilme foi lavado três vezes com solução salina estéril (0,9%), e foi desagregado com auxílio do homogeneizador ultrassônico, com potência de 25% por 30 s. Em seguida, a suspensão microbiana foi diluída (10^{-2} ; 10^{-4} ; 10^{-6} e 10^{-8}) e 20 μ L de cada diluição foi inoculada, pela técnica da gota, em ágar Brucella acrescido de sangue, ágar BHI (Himedia) ou ágar Sabouraud-dextrose (Himedia). Para os biofilmes heterotípicos foram semeados em duplicata, em meios de cultura seletivos para cada micro-organismo: Ágar Sabouraud Dextrose (Himedia) acrescido com 50 mg/L de cloranfenicol (União Química) para *C. albicans*, Ágar Mitis Salivarius Bacitracina Sacarose, acrescido de 2 UI/mL de Bacitracina e 150 g/L sacarose (Difco) para *S. mutans*; e Ágar BHI (Himedia) acrescido 0,75% de NaCl para *S. aureus* e Ágar MacConkey (Acumedia - Neogen) para *P. aeruginosa*. As placas foram incubadas por 48 h (Figura 5), foi feita a contagem de colônias (UFC/mL), em placas que apresentaram entre 30 e 300 colônias.

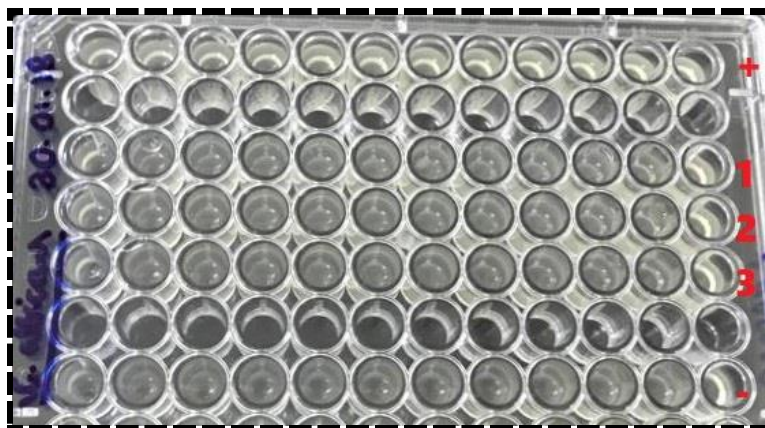
Foram realizados três experimentos independentes, com 4 repetições cada, totalizando N=12.

Figura 3- Biofilme aderido em fundo de placa



Fonte: Elaborada pelo autor.

Figura 4- Aplicação dos Tratamentos em biofilme. +) Controle positivo (Clorexidina 0,12%), 1,2 e 3) Diferentes concentrações do extrato glicólico de *Zingiber officinale* em ordem decrescente, -) Controle negativo (salina 0,9% ou meio de cultura)



Fonte: Elaborada pelo autor.

Figura 5- Crescimento microbiano das suspensões após os tratamentos nas diluições 10^{-2} ; 10^{-4} ; 10^{-6} e 10^{-8} , para contagem de UFC



Fonte: Elaborada pelo autor.

3.2 Avaliação da citotoxicidade do extrato em cultura celular

A citotoxicidade do extrato foi analisada pelo método colorimétrico MTT, que avalia a atividade mitocondrial das células, seguindo a metodologia de Oliveira et al. (2013, 2014).

Foram utilizadas culturas de macrófagos de camundongo (RAW 264.7), e de queratinócitos humanos (HaCaT) provenientes do Banco de Células do Rio de Janeiro - Associação Técnico Científica Paul Ehrlich (APABCAM - RJ).

As células foram cultivadas em meio de Eagle modificado por Dulbecco (DMEM - LGC Biotecnologia), suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB) (Invitrogen) em frascos de cultivo celular (TPP), em estufa à de 37°C, e 5% de CO₂.

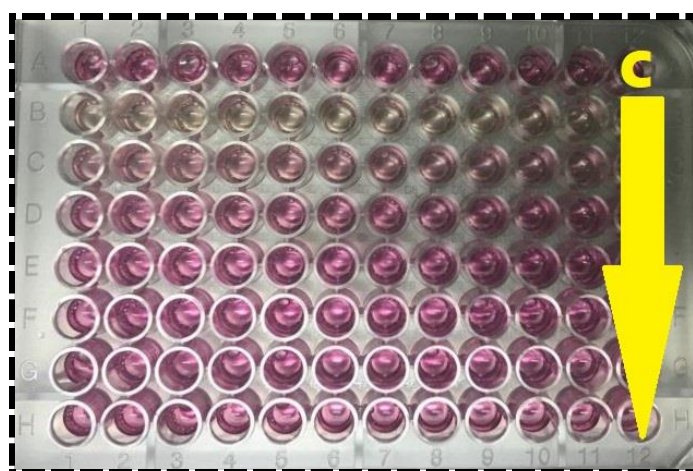
O meio de cultura foi trocado a cada 48 h. Quando foi observado estado de subconfluência das células, caracterizado pela ocupação de mais de 70% do frasco, a monocamada de células do assoalho do frasco de cultura foi desagregada com auxílio de varredor celular. As células suspendidas foram centrifugadas por 5 min a 3000 rpm. A contagem de células se deu pelo teste de exclusão pelo azul de Trypan, e as células viáveis foram quantificadas na câmara de Neubauer.

Após a contagem foram adicionados 200 µL de meio DMEM suplementado com 10% SFB contendo 2×10^4 células viáveis em cada poço da placa de 96 poços (TPP) e incubadas em estufa (37°C, com 5% de CO₂) por 24 h. Após esse período de aderência inicial, o sobrenadante foi descartado, as células foram lavadas com PBS, e acrescentado 200 µL/poço do extrato, em diluição seriada. As células dos poços do grupo controle receberam apenas meio de cultura. O tempo de contato do extrato foram de 5 min e 24 h e cada grupo apresentou N=12 (Figura 6).

Após o tempo de contato os poços foram lavados com PBS, e foram adicionados 100 µL/poço da solução de MTT, com suspensão de 0,5 mg do pó de MTT (Sigma Aldrich Co.) em 1 mL de Phosphate Buffer Saline (PBS), as placas foram incubadas durante 1 h, ao abrigo da luz, logo após a solução é retirada e adicionados 100 µL/poço de dimetilsulfóxido (DMSO – Sigma) para expor os cristais de formazina produzidos, após absorção do sal de MTT, por células viáveis (Figura 7). Após incubação de 10 min e 10 min de 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 empregando-se a seguinte fórmula:

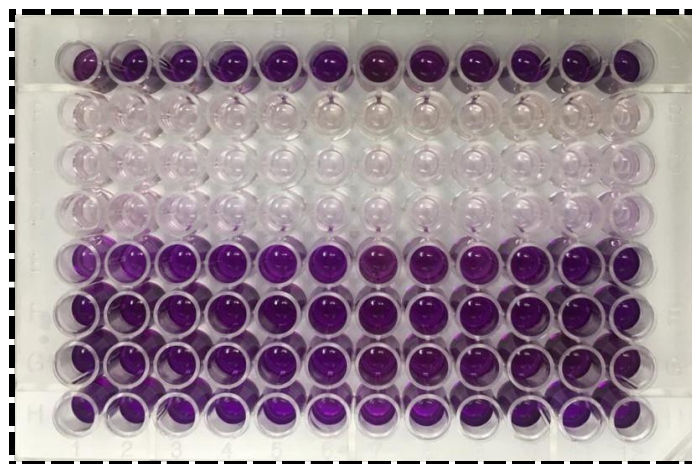
$$\% \text{ Viabilidade} = (\text{DO Grupo Tratado} \times 100) / \text{Média DO Grupo Controle}$$

Figura 6- Aplicação dos tratamentos sobre as células para análise citotóxica. c) controle negativo (salina 0,9% ou meio de cultura), seta) diferentes concentrações do extrato glicólico de *Zingiber officinale* em ordem decrescente



Fonte: Elaborada pelo autor.

Figura 7- Resultado do teste de citotoxicidade após aplicação do teste de MTT



Fonte: Elaborada pelo autor.

3.3 Análise estatística

Os dados foram analisados pelo Graph Pad Prism quanto a sua distribuição, os dados que obtiveram distribuição normal foram analisados pelo método ANOVA complementado pelo Teste de Tukey, com nível de significância de 5%. E os dados que não obtiveram distribuição normal foram analisados pelo teste Kruskal-Wallis complementado com o Teste de Comparação Múltipla de Dunn ($p \leq 0.05$).

4 RESULTADOS

4.1 Atividade antimicrobiana

4.1.1 Concentração Inibitória Mínima (CIM) e Concentração Microbicida Mínima (CMM)

Os testes iniciais que determinaram a CIM e CMM para os micro-organismos aeróbios (Tabela 1), obtiveram como resultado as concentrações para CIM de 50 mg/mL do extrato e para CMM de 100 mg/mL na cultura planctônica de *S. aureus*, CIM e CMM na concentração 12,5 mg/mL para *C. albicans* e 3,125 mg/mL para *P. aeruginosa*. A cultura de *S. mutans* não obteve CIM e CMM, sendo utilizada, em biofilmes, na concentração máxima do extrato.

Tabela 1- Resultados dos testes de Concentração Inibitória Mínima (CIM) e Concentração Microbicida Mínima (CMM) sobre culturas planctônicas dos micro-organismos aeróbios. A cultura de *Streptococcus mutans* não obteve CIM e CMM

Micro-organismo	CIM	CMM
<i>Candida albicans</i>	12,5 mg/mL	12,5 mg/mL
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	3,125 mg/mL	3,125 mg/mL
<i>Staphylococcus aureus</i>	50 mg/mL	100 mg/mL
<i>Streptococcus mutans</i>	-	-

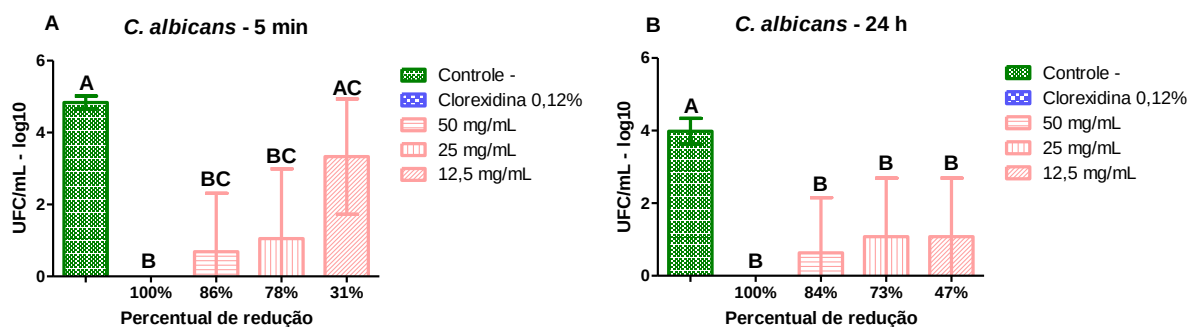
Fonte: Elaborada pelo autor.

Os micro-organismos anaeróbios, *P. gingivalis*, *P. endodontalis* e *P. intermedia*, não obtiveram CIM e CMM, portanto, foram utilizadas as concentrações máximas do extrato, 200, 100 e 50 mg/mL nos tratamentos de 5 min e 100, 50 e 25 mg/mL nos de 24 h.

4.1.2 Biofilmes monotípicos

O extrato glicólico de *Z. officinale* apresentou ação antifúngica sobre biofilme de *C. albicans* no tempo de 5 min (Figura 8A). Pode-se observar que os grupos 50 e 25 mg/mL apresentaram redução do biofilme, sendo estatisticamente semelhantes quando comparados ao tratamento com clorexidina ($p>0,05$). No tempo de 24 h (Figura 8B), todos os tratamentos promoveram redução significativa do biofilme em relação ao controle ($p<0,05$).

Figura 8- Contagem de UFC/mL (log10) após aplicação do extrato glicólico de *Zingiber officinale* (5 min e 24 h) em biofilmes monotípicos de *Candida albicans*

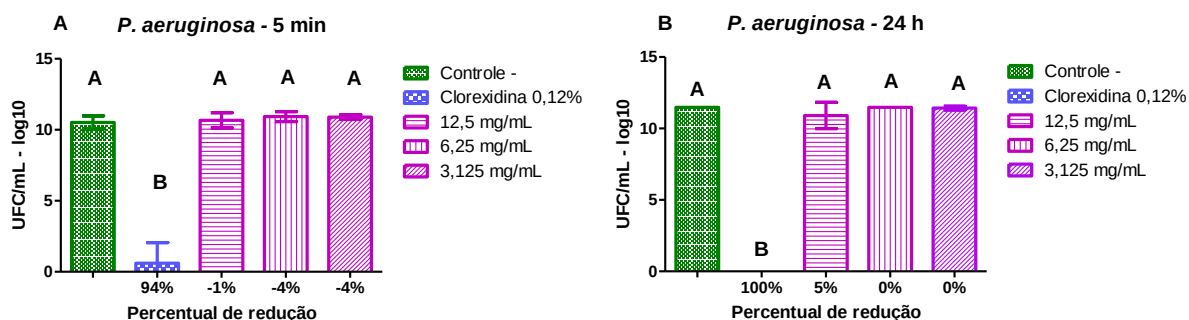


Legenda: a) gráfico indicando os resultados obtidos após os tratamentos de 5 min sobre biofilme de *Candida albicans*. b) gráfico indicando os resultados obtidos após os tratamentos de 24 h sobre biofilme de *C. albicans*. Letras indicam diferença estatística significativa (teste de Kruskal-Wallis complementado pelo teste de comparação múltipla de Dun's, $p \leq 0,05$).

Fonte: Elaborada pelo autor.

A Figura 9 demonstra que para *P. aeruginosa* o extrato de *Z. officinale*, nas concentrações 12,5, 6,25 e 3,125 mg/mL, não apresentou atividade antibiofilme, tanto no tratamento de 5 min (Figura 9A) como no de 24 h (Figura 9B).

Figura 9- Contagem de UFC/mL (log10) após aplicação do extrato glicólico de *Zingiber officinale* (5 min e 24 h) em biofilmes monotípicos de *Pseudomonas aeruginosa*

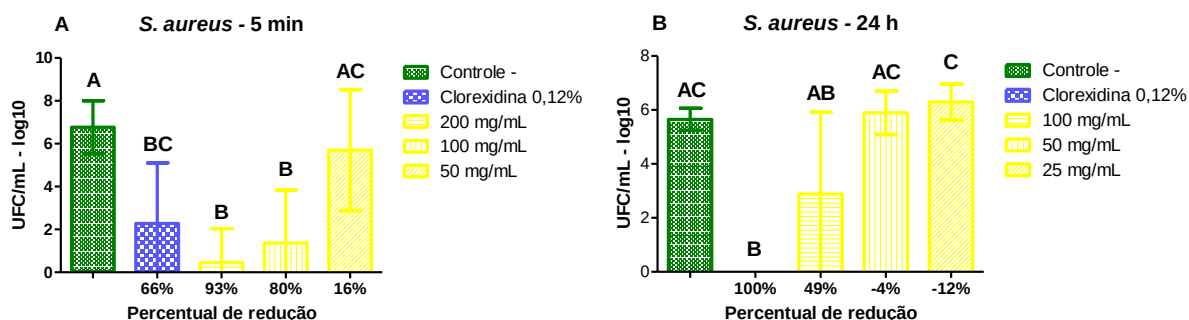


Legenda: a) gráfico indicando os resultados obtidos após os tratamentos de 5 min sobre biofilme de *Pseudomonas aeruginosa*. b) gráfico indicando os resultados obtidos após os tratamentos de 24 h sobre biofilme de *P. aeruginosa*. Letras indicam diferença estatística significativa (teste de Kruskal-Wallis complementado pelo teste de comparação múltipla de Dun's, $p \leq 0,05$).

Fonte: Elaborada pelo autor.

A Figura 10A demonstra que o extrato glicólico de *Z. officinale* apresentou atividade antibiofilme nas concentrações 200 e 100 mg/mL no tempo de contato de 5 min, sendo todas as concentrações semelhantes estatisticamente ao tratamento com clorexidina 0,12%. Mas no tempo de 24 h (Figura 10B) as concentrações 100, 50 e 25 mg/mL não apresentaram diferença estatística significativa em relação ao controle.

Figura 10- Contagem de UFC/mL (log10) após aplicação do extrato glicólico de *Zingiber officinale* (5 min e 24 h) em biofilmes monotípicos de *Staphylococcus aureus*

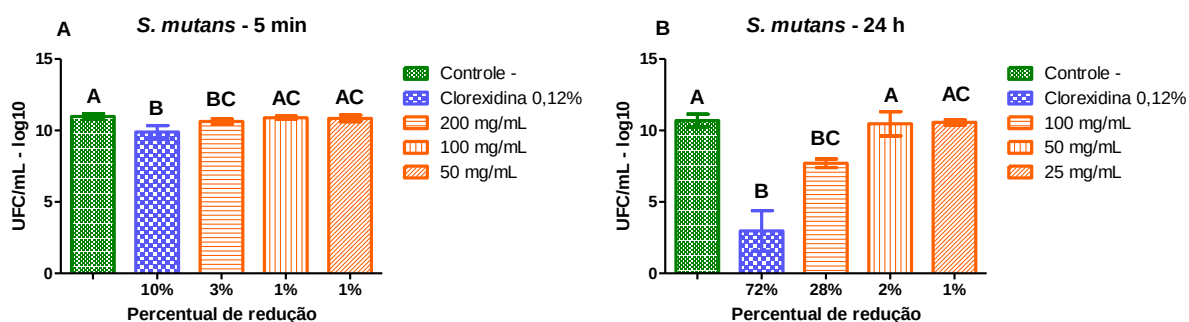


Legenda: a) gráfico indicando os resultados obtidos após os tratamentos de 5 min sobre biofilme de *Staphylococcus aureus*. b) gráfico indicando os resultados obtidos após os tratamentos de 24 h sobre biofilme de *S. aureus*. Letras indicam diferença estatística significativa (teste de Kruskal-Wallis complementado pelo teste de comparação múltipla de Dun's, $p \leq 0,05$).

Fonte: Elaborada pelo autor.

Para *S. mutans* o extrato glicólico de *Z. officinale* apresentou redução do biofilme na concentração 200 mg/mL no tempo de 5 min (Figura 11A) e na concentração de 100 mg/mL para o tempo de contato de 24 h (Figura 11B).

Figura 11- Contagem de UFC/mL (log10) após aplicação do extrato glicólico de *Zingiber officinale* (5 min e 24 h) em biofilmes monotípicos de *Streptococcus mutans*



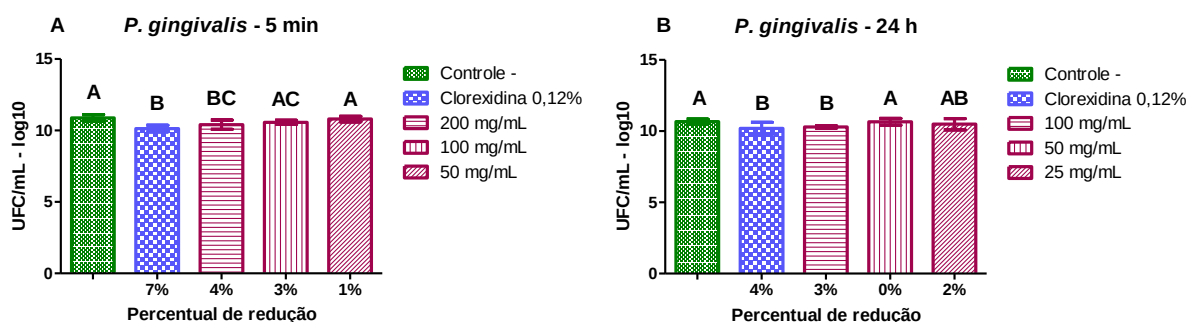
Legenda: a) gráfico indicando os resultados obtidos após os tratamentos de 5 min sobre biofilme de *Streptococcus mutans*. b) gráfico indicando os resultados obtidos após os tratamentos de 24 h sobre biofilme de *S. mutans*. Letras indicam diferença estatística significativa (teste de Kruskal-Wallis complementado pelo teste de comparação múltipla de Dun's, $p \leq 0,05$).

Fonte: Elaborada pelo autor.

As próximas figuras (Figuras 12, 13 e 14) apresentam os resultados dos tratamentos com extrato glicólico de *Z. officinale* sobre as bactérias anaeróbias.

P. gingivalis apresentou redução do biofilme nos tratamentos de maior concentração, 200 mg/mL em 5 min (Figura 12A) e 100 mg/mL em 24 h (Figura 12B), sendo esses semelhantes aos tratamentos com clorexidina 0,12%.

Figura 12- Contagem de UFC/mL (log10) após aplicação do extrato glicólico de *Zingiber officinale* (5 min e 24 h) em biofilmes monotípicos de *Porphyromonas gingivalis*

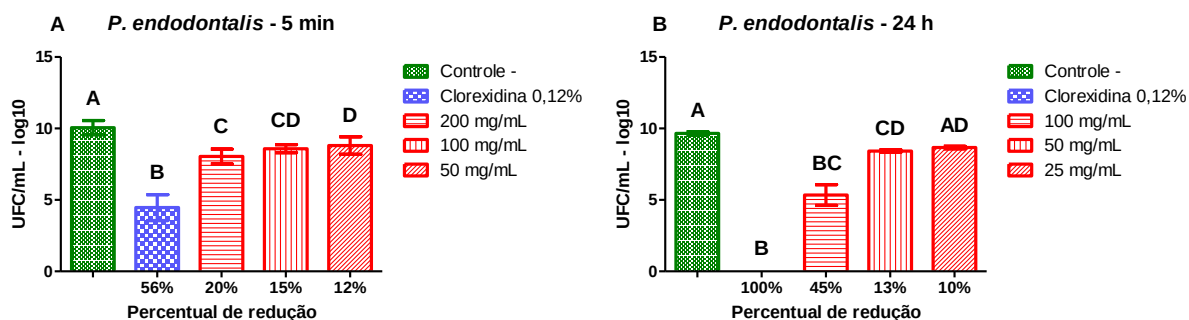


Legenda: a) gráfico indicando os resultados obtidos após os tratamentos de 5 min sobre biofilme de *Porphyromonas gingivalis*. b) gráfico indicando os resultados obtidos após os tratamentos de 24 h sobre biofilme de *P. gingivalis*. Letras indicam diferença estatística significativa (teste de Kruskal-Wallis complementado pelo teste de comparação múltipla de Dun's, $p \leq 0,05$).

Fonte: Elaborada pelo autor.

O tratamento com extrato glicólico de *Z. officinale* realizado sobre a cepa de *P. endodontalis* obteve redução em todas as concentrações no tempo de 5 min (Figura 13A), sendo essas de 20 a 12% e também nas duas concentrações, 100 e 50 mg/mL, no tempo de tratamento de 24 h (Figura 13B), tendo até 45% de redução do biofilme no primeiro.

Figura 13- Contagem de UFC/mL (log10) após aplicação do extrato glicólico de *Zingiber officinale* (5 min e 24 h) em biofilmes monotípicos de *Porphyromonas endodontalis*

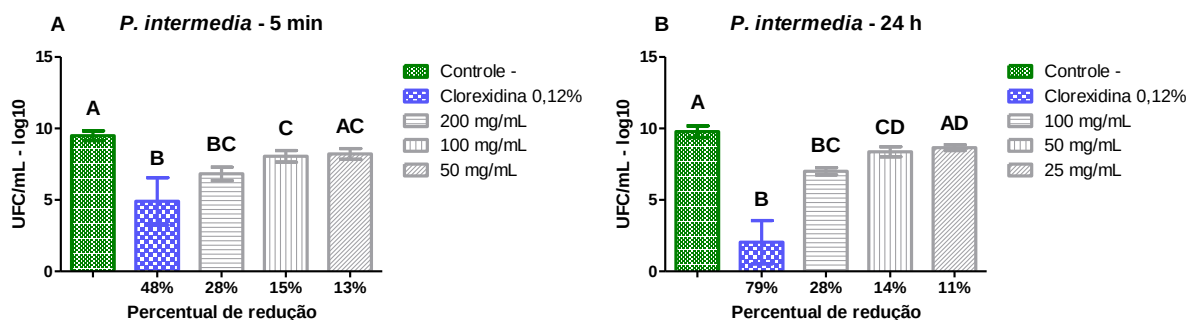


Legenda: a) gráfico indicando os resultados obtidos após os tratamentos de 5 min sobre biofilme de *Porphyromonas endodontalis*. b) gráfico indicando os resultados obtidos após os tratamentos de 24 h sobre biofilme de *P. endodontalis*. Letras indicam diferença estatística significativa (método ANOVA complementado pelo Teste de Tukey (A) e teste de Kruskal-Wallis complementado pelo teste de comparação múltipla de Dun's (B), $p \leq 0,05$).

Fonte: Elaborada pelo autor.

O extrato glicólico de *Z. officinale* apresentou ação antimicrobiana sobre a cepa de *P. intermedia*, apresentou redução do seu biofilme nas duas maiores concentrações, com até 28% de redução na maior concentração, nos dois tempos de tratamento, 200 e 100 mg/mL no tempo de 5 min (Figura 14A) e 100 e 50 mg/mL em 24 h (Figura 14B).

Figura 14- Contagem de UFC/mL (log10) após aplicação do extrato glicólico de *Zingiber officinale* (5 min e 24 h) em biofilmes monotípicos de *Prevotella intermedia*



Legenda: a) gráfico indicando os resultados obtidos após os tratamentos de 5 min sobre biofilme de *Prevotella intermedia*. b) gráfico indicando os resultados obtidos após os tratamentos de 24 h sobre biofilme de *P. intermedia*. Letras indicam diferença estatística significativa (teste de Kruskal-Wallis complementado pelo teste de comparação múltipla de Dun's, $p \leq 0,05$).

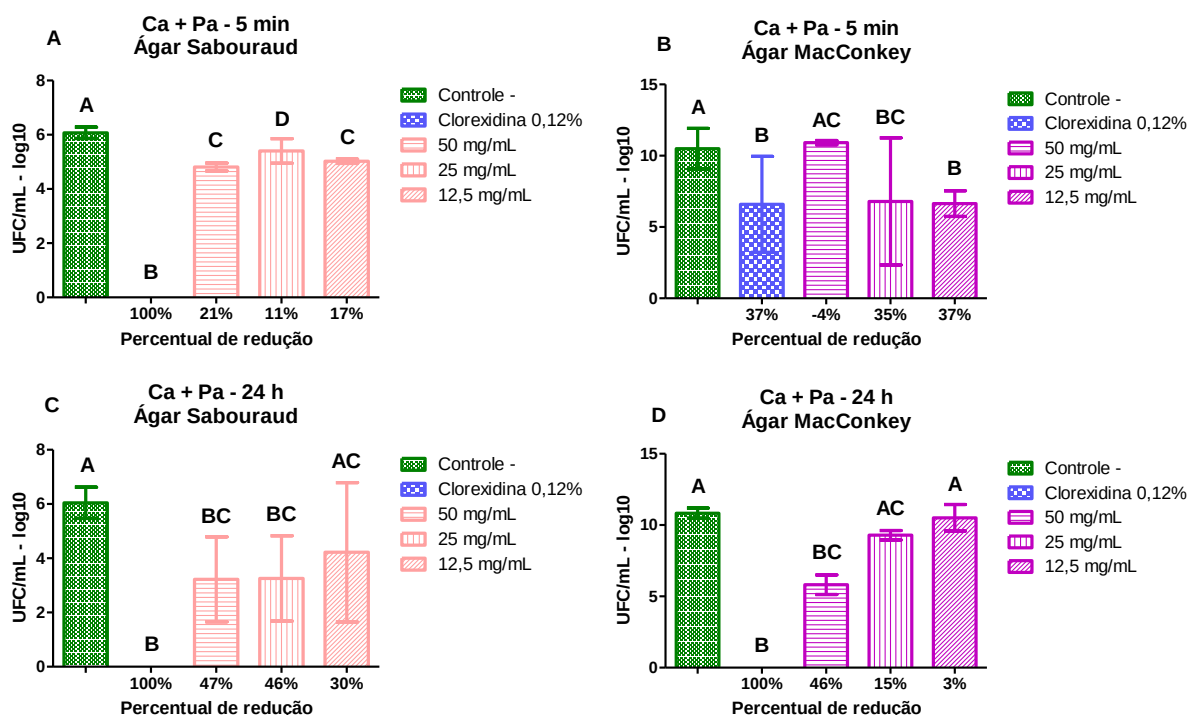
Fonte: Elaborada pelo autor.

4.1.3 Biofilmes heterotípicos

Na interação *C. albicans* e *P. aeruginosa*, no tempo de 5 min, o extrato foi capaz de reduzir o biofilme de *C. albicans* (Figura 15A) em todas as concentrações usadas (50, 25 e 12,5 mg/mL), e houve redução de *P. aeruginosa* (Figura 15B) em duas concentrações (25 e 12,5 mg/mL).

Em 24 h, o extrato foi capaz de reduzir o biofilme de *C. albicans* (Figura 15C) nas duas maiores concentrações, e teve ação sobre *P. aeruginosa* (Figura 15D) na maior concentração, com mais de 45% de redução.

Figura 15- Contagem de UFC/mL (log10) após aplicação do extrato glicólico de *Zingiber officinale* (5 min) em biofilme heterotípico de *Candida albicans* (Ca) e *Pseudomonas aeruginosa* (Pa)



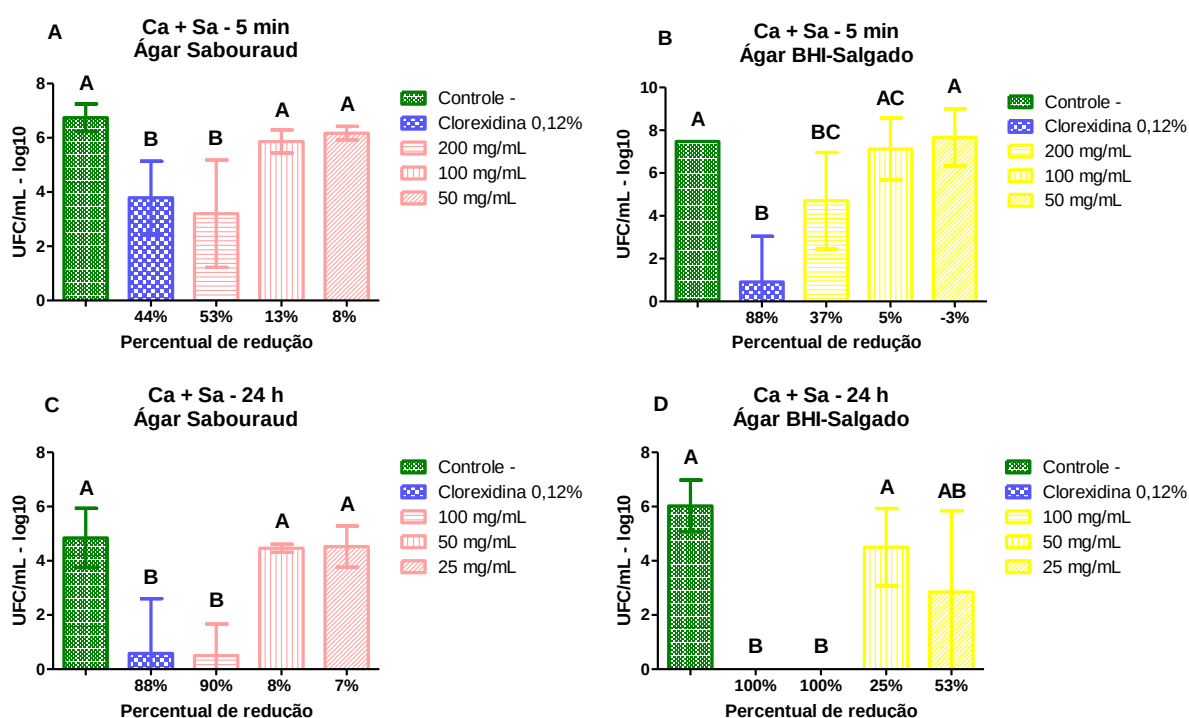
Legenda: a) gráfico indicando os resultados obtidos após os tratamentos de 5 min sobre biofilme misto de *Candida albicans* e *Pseudomonas aeruginosa*, Ágar Sabouraud com cloranfenicol, seletivo para *C. albicans*. b) gráfico indicando os resultados obtidos após os tratamentos de 5 min sobre biofilme misto de *C. albicans* e *P. aeruginosa*, Ágar MacConkey, seletivo para *P. aeruginosa*. c) gráfico indicando os resultados obtidos após os tratamentos de 24 h sobre biofilme misto de *C. albicans* e *P. aeruginosa*, Ágar Sabouraud com cloranfenicol, seletivo para *C. albicans*. b) gráfico indicando os resultados obtidos após os tratamentos de 24 h sobre biofilme misto de *C. albicans* e *P. aeruginosa*, Ágar MacConkey, seletivo para *P. aeruginosa*. Letras indicam diferença estatística significativa (método ANOVA complementado pelo Teste de Tukey (A) e teste de Kruskal-Wallis complementado pelo teste de comparação múltipla de Dun's (B, C e D), $p \leq 0,05$).

Fonte: Elaborada pelo autor.

No biofilme heterotípico de *C. albicans* e *S. aureus* o extrato glicólico de *Z. officinale* foi efetivo na redução de ambos os micro-organismos (Figura 16A e 16B) na maior concentração utilizada (200 mg/mL), estatisticamente semelhante a clorexidina. No tempo de tratamento de 24 h o extrato também foi efetivo na maior concentração utilizada, em ambos os micro-organismos (Figura

16C e 16D), sendo essa concentração 100 mg/mL.

Figura 16- Contagem de UFC/mL (log10) após aplicação do extrato glicólico de *Zingiber officinale* (5 min e 24 h) em biofilmes heterotípicos de *Candida albicans* (Ca) e *Staphylococcus aureus* (Sa)



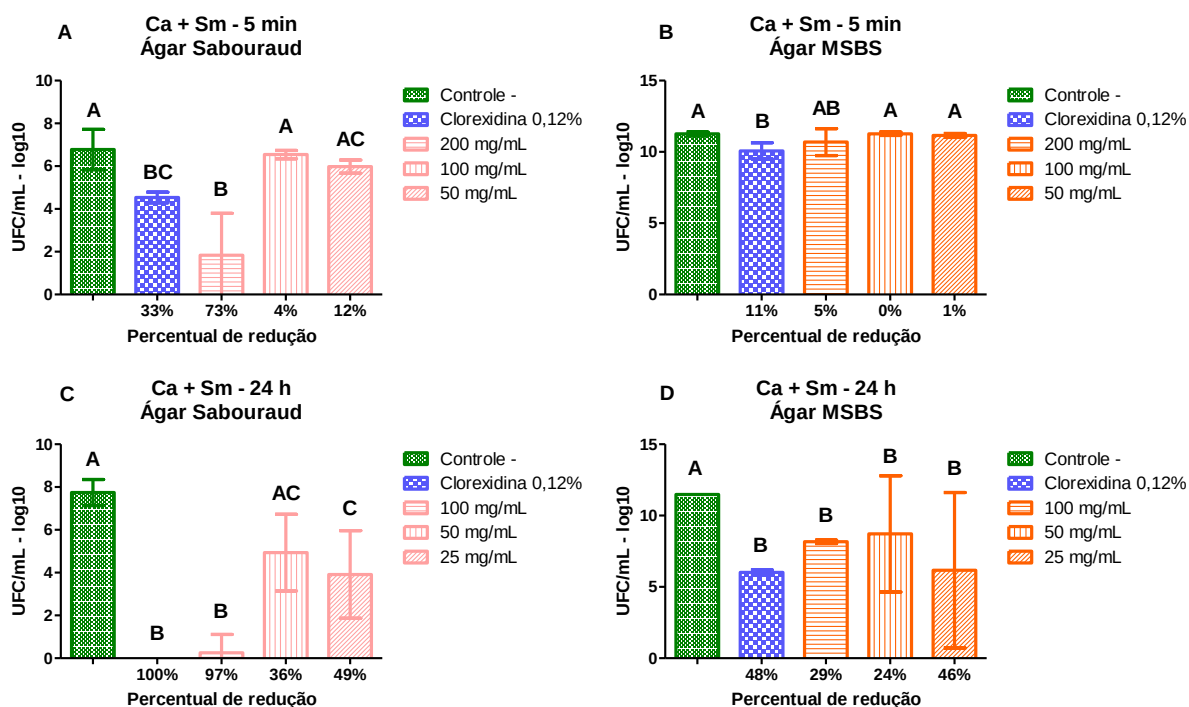
Legenda: a) gráfico indicando os resultados obtidos após os tratamentos de 5 min sobre biofilme misto de *Candida albicans* e *Staphylococcus aureus*, Ágar Sabouraud com cloranfenicol, seletivo de *C. albicans*. b) gráfico indicando os resultados obtidos após os tratamentos de 5 min sobre biofilme misto de *C. albicans* e *S. aureus*, Ágar BHI-Salgado seletivo para *S. aureus*. c) gráfico indicando os resultados obtidos após os tratamentos de 24 h sobre biofilme misto de *C. albicans* e *S. aureus*, Ágar Sabouraud com cloranfenicol, seletivo de *C. albicans*. d) gráfico indicando os resultados obtidos após os tratamentos de 24 h sobre biofilme misto de *C. albicans* e *S. aureus*, Ágar BHI-Salgado seletivo para *S. aureus*. Letras indicam diferença estatística significativa (Teste de Kruskal-Wallis complementado pelo teste de comparação múltipla de Dun's, $p \leq 0,05$).

Fonte: Elaborada pelo autor.

Na interação *C. albicans* e *S. mutans* o extrato não promoveu redução de *S. mutans* no tempo de 5 min (Figura 17B) porém reduziu o biofilme de *C. albicans* na concentração 200 mg/mL (Figura 17A). No tempo de 24 h houve

redução de *C. albicans* (Figura 17C) em duas concentrações (100 e 25 mg/mL), e redução em todas as concentrações (100, 50 e 25 mg/mL) da bactéria (Figura 17D).

Figura 17- Contagem de UFC/mL (log10) após aplicação do extrato glicólico de *Zingiber officinale* (5 min e 24 h) em biofilmes heterotípicos de *Candida albicans* (Ca) e *Streptococcus mutans* (Sm)



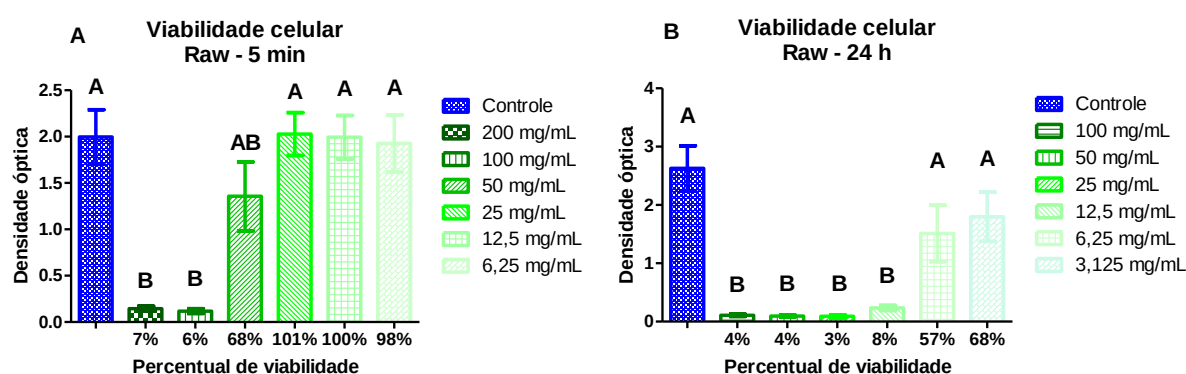
Legenda: a) gráfico indicando os resultados obtidos após os tratamentos de 5 min sobre biofilme misto de *Candida albicans* e *Streptococcus mutans*, Ágar Sabouraud com cloranfenicol, seletivo de *C. albicans*. b) gráfico indicando os resultados obtidos após os tratamentos de 5 min sobre biofilme misto de *C. albicans* e *S. mutans*, Ágar Mitis Salivarius Bacitracina Sacarose (MSBS) seletivo para *S. mutans*. c) gráfico indicando os resultados obtidos após os tratamentos de 24 h sobre biofilme misto de *C. albicans* e *S. mutans*, Ágar Sabouraud com cloranfenicol, seletivo de *C. albicans*. d) gráfico indicando os resultados obtidos após os tratamentos de 24 h sobre biofilme misto de *C. albicans* e *S. mutans*, Ágar MSBS seletivo para *S. mutans*. Letras indicam diferença estatística significativa (Teste de Kruskal-Wallis complementado pelo teste de comparação múltipla de Dun's, $p \leq 0,05$).

Fonte: Elaborada pelo autor.

4.2 Citotoxicidade do extrato em cultura celular

No teste de citotoxicidade do extrato glicólico de *Z. officinale*, os macrófagos de camundongo mostraram-se viabilidade celular superior a 50% à partir de 50 mg/mL no tempo de 5 min (Figura 18A), e 6,25 mg/mL na cultura de 24 h (Figura 18B).

Figura 18- Citotoxicidade do extrato glicólico de *Zingiber officinale* sobre cultura de macrófagos de camundongo (RAW 264.7)

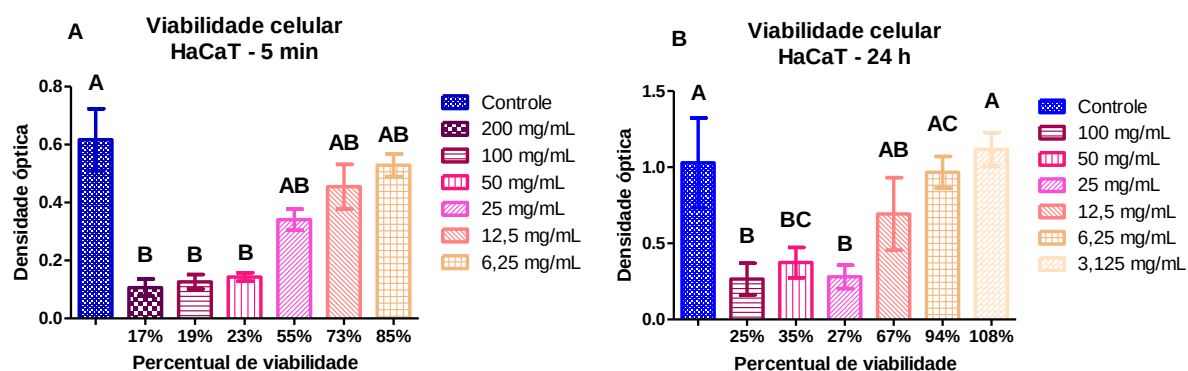


Legenda: a) gráfico indicando os resultados de citotoxicidade do extrato glicólico de *Zingiber officinale* sobre macrófagos de camundongo (Raw) após os tratamentos de 5 min. b) gráfico indicando os resultados de citotoxicidade do extrato glicólico de *Z. officinale* sobre Raw após os tratamentos de 24 h. Letras indicam diferença estatística significativa (Teste de Kruskal-Wallis complementado pelo teste de comparação múltipla de Dun's, $p \leq 0,05$).

Fonte: Elaborada pelo autor.

O tratamento de 5 min do extrato sobre cultura de queratinócitos humanos, mostrou que o extrato apresenta viabilidade celular superior a 50%, para essas células, à partir de 25 mg/mL no tempo de 5 min (Figura 19A) e à partir de 12,5 mg/mL no tempo de contato de 24 h (Figura 19B).

Figura 19- Citotoxicidade do extrato glicólico de *Zingiber officinale* sobre cultura de queratinócitos humanos (HaCaT)



Legenda: a) gráfico indicando os resultados de citotoxicidade do extrato glicólico de *Zingiber officinale* sobre queratinócitos humanos (Hacat) após os tratamentos de 5 min. b) gráfico indicando os resultados de citotoxicidade do extrato glicólico de *Z. officinale* sobre HaCaT após os tratamentos de 24 h. Letras indicam diferença estatística significativa (Teste de Kruskal-Wallis complementado pelo teste de comparação múltipla de Dun's, $p \leq 0,05$).

Fonte: Elaborada pelo autor.

5 DISCUSSÃO

O extrato glicólico de *Z. officinale* (gengibre) avaliado nesse estudo apresentou potencial antimicrobiano sobre os biofilmes monotípicos de *C. albicans*, *S. aureus*, *S. mutans*, *P. gingivalis*, *P. endodontalis* e *P. intermedia*, assim como sobre os biofilmes mistos de *C. albicans* e *P. aeruginosa*, *C. albicans* e *S. aureus*, *C. albicans* e *S. mutans*.

C. albicans é um fungo dimórfico, sendo sua forma de hifa a mais virulenta, é a espécie de *Candida* mais isolada em candidoses e em estomatites protéticas (Jorge, 2012). Nesse estudo, observou-se que o extrato glicólico de *Z. officinale* apresentou boa ação antimicrobiana sobre *C. albicans*, revelando um dos melhores resultados sobre culturas planctônicas (CIM e CMM de 12,5 mg/mL). Apresentou também mais de 80% de redução do biofilme, tanto em 5 min como em 24 h na concentração de 50 mg/mL. Em estudos anteriores, já foi demonstrada a eficácia do *Z. officinale* sobre cepas de *C. albicans*. Aghazadeh et al. (2016) avaliaram a atividade antifúngica de extrato etanólico de *Z. officinale* sobre *C. albicans*, relatando 5 mg/mL como CIM, e boa atividade antibiofilme sobre o fungo, semelhantes aos resultados obtidos no presente estudo. Ashraf et al. (2017) avaliaram a atividade antifúngica do óleo essencial de *Z. officinale*, usando como metodologia o teste de difusão em ágar, e relataram mais de 80% de inibição do crescimento de *C. albicans*. Lee et al. (2018) também analisaram o potencial antibiofilme do *Z. officinale* sobre o fungo em questão, avaliando alguns de seus compostos (6-gingerol, 8-gingerol, 6-shogaol). Os autores observaram até 88% de redução do biofilme de *C. albicans*, principalmente nas concentrações 100 e 50 mg/mL.

P. aeruginosa é considerada uma bactéria de grande interesse médico, por apresentar diversos fatores de virulência e desenvolver resistência aos

antimicrobianos o que nos levou a utilizá-la nesse estudo (Jorge, 2012). O extrato glicólico de *Z. officinale* obteve boa ação antibacteriana sobre cultura planctônica de *P. aeruginosa* no presente estudo, revelando CIM e CMM em 3,125 mg/mL. Por outro lado, não ocorreu atividade antibiofilme nas concentrações testadas nos biofilmes monotípicos. Na literatura são encontrados resultados promissores em relação ao uso do *Z. officinale* como antimicrobiano para *P. aeruginosa*. Aghazadeh et al (2016), por exemplo, utilizaram um extrato etanólico de *Z. officinale*, e obtiveram CIM de 40 mg/mL. No presente estudo o extrato foi colocado em contato direto com os micro-organismos, ou sobre o seu biofilme, que é responsável por aumentar a sua virulência. Já em estudos que apresentam o teste de difusão em ágar como metodologia, e utilizam óleos essenciais de *Z. officinale*, pode-se observar boa ação do *Z. officinale*, inibindo o crescimento de *P. aeruginosa* (Ashraf et al., 2017; Intorasoot et al., 2017).

S. aureus é responsável por muitas infecções piogênicas, além disso, também pode ser encontrado em pulpites e estomatites, importantes na odontologia (Jorge, 2012). O extrato glicólico de *Z. officinale* apresentou ação antibacteriana sobre a cepa de *S. aureus*, obtendo-se CIM de 50 mg/mL e CMM de 100 mg/mL. Aghazadeh et al. (2016) em estudo semelhante, testaram a ação antimicrobiana do extrato etanólico de *Z. officinale* sobre *S. aureus* e obtiveram como resultado que 20 mg/mL do extrato foi capaz de inibir (CIM) o crescimento da bactéria, concentração menor que a encontrada nesse estudo. Entretanto, deve-se considerar que tipo de solvente (álcool) utilizado para obtenção extrato, pode ter atuado nos resultados. Rampogu et al. (2018) testaram a ação antimicrobiana de alguns compostos específicos do *Z. officinale*, gingerenone-A e shogaol, e observaram que ambos mostraram boa atividade antibacteriana sobre *S. aureus*. Avaliando a ação do *Z. officinale* sobre cepa de *S. aureus*, em testes que utilizam a metodologia de difusão em ágar, Qadir et al. (2017) testaram extratos metanólico, etanólico, fenólico e aquoso de *Z.*

officinale, na concentração 10 mg/mL, e obtiveram boa ação antimicrobiana sobre *S. aureus*. Um outro estudo, utilizou óleo essencial de *Z. officinale* e obteve 66% de inibição no crescimento de *S. aureus* (Ashraf et al., 2017). Ainda com a mesma metodologia, Intorasoot et al. (2017) utilizaram óleo volátil de *Z. officinale* e obtiveram inibição no crescimento de *S. aureus*. Os efeitos obtidos com baixas concentrações, possivelmente estejam relacionadas tanto ao tipo de solvente, quanto ao contato indireto, por difusão em ágar, dos extratos. No presente estudo utilizou-se contato direto do extrato glicólico de *Z. officinale* com o biofilme de *S. aureus* formado em fundo de placa, obtendo como resultado mais de 90% de redução em 200 mg/mL e 80% em 100 mg/mL, no tempo de tratamento de 5 min, sendo semelhante ao tratamento com clorexidina 0,12%.

S. mutans é uma das principais espécies relacionadas com a etiologia da cárie, adere-se a superfície de esmalte, principalmente quando há dieta rica em sacarose (Jorge, 2012). Nos resultados do presente estudo, o extrato glicólico de *Z. officinale* apresentou redução do biofilme de *S. mutans* nas concentrações de 200 mg/mL em 5 min e 100 mg/mL em 24 h. O extrato de *Z. officinale* não apresentou, entretanto, CMM nas concentrações testadas. Hasan et al., (2015) também observaram a ação antibacteriana do *Z. officinale* sobre *S. mutans*, porém utilizaram extrato bruto e fração de metanol. Os autores observaram CIM em 256 mg/mL para os dois extratos testados. A redução do biofilme foi observada pelos autores, revelando resultados demais de 80% de redução, semelhantes ao presente estudo, onde também houve diminuição do biofilme.

Ainda são escassos na literatura, testes que avaliem a atividade antimicrobiana de extratos de *Z. officinale* sobre micro-organismos anaeróbios. Nesse estudo, foram utilizados *P. gingivalis*, *P. endodontalis* e *P. intermedia*, bactérias associadas a doença periodontal e as *Porphyromonas* também são encontradas em lesões endodônticas. São bacilos Gram-negativos anaeróbios

obrigatórios (Jorge, 2012). Nossos resultados pareceram muito promissores, pois o extrato glicólico de *Z. officinale* apresentou atividade antibiofilme sobre *P. gingivalis* nos dois tempos de tratamento avaliados, na maior concentração utilizada. Para *P. endodontalis*, todas as concentrações utilizadas foram capazes de reduzir biofilme formado por esta bactéria, observando-se redução de até 45%. Os tratamentos realizados em biofilmes de *P. intermedia* com o extrato glicólico de *Z. officinale*, apresentaram redução nas concentrações de 200 e 100 mg/mL em 5 min e 100 e 50 mg/mL em 24 h. O único estudo encontrado na literatura que relacionaram micro-organismos anaeróbios com extrato de *Z. officinale*, utilizaram as mesmas bactérias anaeróbias (*P. gingivalis*, *P. endodontalis* e *P. intermedia*) do presente estudo. Os autores utilizaram extrato etanólico e n-hexano de *Z. officinale* e obtiveram ação antibacteriana sobre as cepas testadas, relatando CIM de 50 µg/mL (Park et al., 2008). No estudo de Park et al. (2008) foram realizados apenas testes sobre culturas planctônicas e os autores obtiveram bons resultados. Deve ser ressaltado, entretanto, que os testes em biofilme são muito importantes, pois a doença periodontal inicia-se com acúmulo de biofilme dental.

O biofilme é formado por uma complexa interação de micro-organismos embebidos em uma matriz extracelular. Entre as microcolônias bacterianas são encontrados canais de água que permitem a passagem de água e nutrientes. O biofilme oferece proteção aos micro-organismos a fatores ambientais ou produtos tóxicos (antimicrobianos), e possibilita a sinalização entre bactérias (*Quorum Sensing*), essa comunicação proporciona certas características a esse biofilme, como a expressão de genes de resistência (Jorge, 2012). Sendo assim, esse estudo analisou a ação antimicrobiana do extrato glicólico de *Z. officinale* sobre biofilmes mistos, nos quais *C. albicans* interagiram com *P. aeruginosa*, *S. aureus* e *S. mutans* separadamente. Na literatura não foram encontrados estudos que utilizaram o *Z. officinale* como antimicrobiano em biofilmes heterotípicos.

Porém, encontram-se dois estudos que utilizam extratos naturais sobre as mesmas interações microbianas utilizadas aqui. Esses estudos avaliaram a atividade antibiofilme dos extratos glicólicos de *Rosmarinus officinalis* L. e *Thymus vulgaris* L. sobre as interações de *C. albicans* com *S. aureus*, *S. mutans*, *P. aeruginosa* e *E. faecalis*, pelo tempo de contato de 5 min. Ambos os estudos, apresentaram redução de todos os micro-organismos, demonstrando a importância dos extratos naturais como potenciais antimicrobianos nas interações entre bactérias e *C. albicans* (Oliveira et al., 2017a, 2017b). No presente estudo foram testados dois tempos de contato, 5 min e 24 h, com o propósito de avaliar efeitos mais prolongados do medicamento e não apenas o contato imediato de 5 min. Os resultados demonstraram que na interação entre *C. albicans* e *S. aureus* as maiores concentrações do extrato obtiveram redução do biofilme em ambas as espécies, sendo que em 24 h foram obtidas redução de mais de 90% de *C. albicans* e 100% de *S. aureus*. Na associação *C. albicans* e *S. mutans*, apesar do extrato não apresentar redução da bactéria no tratamento de 5 min, no de 24 h ocorreu atividade antibiofilme em todas as concentrações. Para *C. albicans* a redução foi de 97% na concentração de 100 mg/mL no tempo de contato de 24 h. Observando-se os resultados da interação de *C. albicans* e *P. aeruginosa*, o extrato glicólico de *Z. officinale* reduziu em até mais de 45% o biofilme de *C. albicans* e *P. aeruginosa*. Observou-se nos nossos resultados que nas interações de *C. albicans* com as bactérias possibilitou melhores resultados do extrato de *Z. officinale* sobre as bactérias, do que nos tratamentos em que elas se encontram sozinhas.

Os fitoterápicos devem ser, como qualquer medicamento, o menos tóxico possível para o paciente. Por isso, nesse estudo foi feito o teste de citotoxicidade em queratinócitos humanos e macrófagos para uma análise mais completa do extrato. O extrato glicólico de *Z. officinale* não foi citotóxico para os queratinócitos a partir de 25 mg/mL em 5 min e 12,5 mg/mL em 24 h. e para os

macrófagos a partir de 50 mg/mL em 5 min e 6,25 mg/mL em 24 h. Confirmando esse resultado, Aghazadeh et al. (2016) revelaram que o extrato etanólico de *Z. officinale* não foi citotóxico para fibroblastos gengivais humanos (1 mg/mL) em 24, 48 e 72 h. Al-Tamimi et al. (2016) testaram a citotoxicidade do óleo essencial de *Z. officinale* sobre a linhagem celular HT-29 (MS) e teve mais de 50% de viabilidade celular em 80 µL/mL. Sobre a citotoxicidade em relação a enxaguatórios bucais é importante ressaltar sobre a clorexidina que é o medicamento mais utilizado na odontologia, Oliveira et al. (2018) avaliaram a citotoxicidade de diversos enxaguatórios bucais sobre cultura celular de fibroblastos gengivais humanos, eles observaram que o enxaguatório de clorexidina (0,12%) reduziu mais de 96% a viabilidade celular. Müller et al. (2017), também testaram a toxicidade de diferentes enxaguatórios bucais, em 3 linhagens celulares (entre eles, fibroblastos gengivais humanos). O enxaguatório a base de clorexidina (0,2%) apresentou a maior citotoxicidade nas células estudadas, com menos de 20% de viabilidade celular na cultura de fibroblastos. Mesmo com alta toxicidade a clorexidina é usada amplamente por cirurgiões-dentistas como antimicrobiano de escolha em seus tratamentos, no presente estudo o *Z. officinale* apresentou menor citotoxicidade quando comparado a estudos com clorexidina, e apresentou resultados como antimicrobiano, com isso o extrato glicólico de *Z. officinale* tem boas características para uso na odontologia.

6 CONCLUSÃO

Conclui-se que o extrato glicólico *Zingiber officinale* (gengibre) apresentou ação antimicrobiana sobre os biofilmes monotípicos de *C. albicans*, *S. aureus*, *S. mutans*, *P. gingivalis*, *P. endodontalis* e *P. intermedia*, Apresentou também ação sobre os biofilmes heterotípicos nas associação de *C. albicans* com *P. aeruginosa*, com *S. aureus* e com *S. mutans*, em diferentes concentrações. E não foi citotóxico na cultura celular de macrófagos de camundongo (RAW 264.7) e queratinócitos humanos (HaCaT), após exposição ao extrato de *Z. officinale* por 5 min e 24 h.

REFERÊNCIAS*

Agência Nacional de Vigilância Sanitária - ANVISA. Primeiro Suplemento do Formulário de Fitoterápicos da Farmacopeia Brasileira. Brasília (DF): ANVISA; 2018.

Aghazadeh M, Bialvaei AZ, Aghazadeh M, Kabiri F, Saliari N, Yousefi M, et al. Survey of the Antibiofilm and Antimicrobial Effects of *Zingiber officinale* (in vitro Study). Jundishapur J Microbiol. 2016 Fev;9(2): e30167. doi: 10.5812/jjm.30167.

Al-Tamimi M, Rastall B, M Abu-Reidah I. Chemical Composition, Cytotoxic, Apoptotic and Antioxidant Activities of Main Commercial Essential Oils in Palestine: A Comparative Study. Medicines (Basel). 2016 Oct 25;3(4). pii: E27. doi: 10.3390/medicines3040027. PubMed PMID: 28930137; PubMed Central PMCID: PMC5456243.

Ashraf AS, Al-Shammari E, Hussain T, Tajuddin S, Panda BP. In-vitro antimicrobial activity and identification of bioactive components using GC–MS of commercially available essential oils in Saudi Arabia. J Food Sci Technol. 2017 Nov;54(12):3948–58. doi: 10.1007/s13197-017-2859-2.

Avcioglu NH, Sahal G, Bilkay IS. Antibiofilm effects of Citrus limonum and *Zingiber officinale* Oils on biofilm formation of *Klebsiella ornithinolytica*, *Klebsiella oxytoca* and *Klebsiella terrigena* SPECIES. Afr J Tradit Complement Altern Med. 2016 Sep 29;13(6):61-67. doi: 10.21010/ajtcam.v13i6.10. eCollection 2016. PubMed PMID: 28480361; PubMed Central PMCID: PMC5412203.

Barman KL, Jha DK. Comparative chemical constituents and antimicrobial activity of normal and organic ginger oils (*Zingiber officinale* roscoe). Int J Appl Biol Pharm. 2013 Jan-Mar;4(1):259-66.

Burnham CD, Leeds J, Nordmann P, O'Grady J, Patel J. Diagnosing antimicrobial resistance. Nat Rev Microbiol. 2017 Oct 12;15(11):697-703. doi: 10.1038/nrmicro.2017.103. Review. PubMed PMID: 29021600.

* Baseado em: International Committee of Medical Journal Editors Uniform Requirements for Manuscripts Submitted to Biomedical journals: Sample References [Internet]. Bethesda: US NLM; c2003 [atualizado 04 nov 2015; acesso em 25 jun 2017]. U.S. National Library of Medicine; [about 6 p.]. Disponível em: http://www.nlm.nih.gov/bsd/uniform_requirements.html

Chakotiya AS, Tanwar A, Narula A, Sharma RK. Zingiber officinale: Its antibacterial activity on *Pseudomonas aeruginosa* and mode of action evaluated by flow cytometry. Microb Pathog. 2017 Jun;107:254-260. doi: 10.1016/j.micpath.2017.03.029. Epub 2017 Apr 4. PubMed PMID: 28389345.

Chung PY, Chung LY, Navaratnam P. Potential targets by pentacyclic triterpenoids from *Callicarpa farinosa* against methicillin-resistant and sensitive *Staphylococcus aureus*. Fitoterapia. 2014 Apr;94:48-54. doi: 10.1016/j.fitote.2014.01.026. Epub 2014 Feb 5. PubMed PMID: 24508863.

D'Souza SP, Chavannavar SV, Kanchanashri B, Niveditha SB. Pharmaceutical Perspectives of Spices and Condiments as Alternative Antimicrobial Remedy. J Evid Based Complementary Altern Med. 2017 Oct;22(4):1002-1010. doi: 10.1177/2156587217703214. Epub 2017 Apr 28. PubMed PMID: 28449595; PubMed Central PMCID: PMC5871277.

Hasan S, Danishuddin M, Khan AU. Inhibitory effect of *Zingiber officinale* towards *Streptococcus mutans* virulence and caries development: *in vitro* and *in vivo* studies. BMC Microbiol. 2015 Jan 16;15:1. doi: 10.1186/s12866-014-0320-5. PubMed PMID: 25591663; PubMed Central PMCID: PMC4316655.

Intorasoot A, Chornchoem P, Sookkhee S, Intorasoot S. Bactericidal activity of herbal volatile oil extracts against multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii*. J Intercult Ethnopharmacol. 2017 Apr 21;6(2):218-222. doi: 10.5455/jice.20170411091159. eCollection 2017 Apr-Jun. PubMed PMID: 28512603; PubMed Central PMCID: PMC5429082.

Lee JH, Kim YG, Choi P, Ham J, Park JG, Lee J. Antibiofilm and Antivirulence Activities of 6-Gingerol and 6-Shogaol Against *Candida albicans* Due to Hyphal Inhibition. Front Cell Infect Microbiol. 2018 Aug 28;8:299. doi: 10.3389/fcimb.2018.00299. eCollection 2018. PubMed PMID: 30211127; PubMed Central PMCID: PMC6121036.

Maekawa LE, Rossoni RD, Barbosa JO, Jorge AO, Junqueira JC, Valera MC. Different extracts of *Zingiber officinale* decrease *Enterococcus faecalis* infection in *Galleria mellonella*. Braz Dent J. 2015 Mar-Apr;26(2):105-9. doi: 10.1590/0103-6440201300199. PubMed PMID: 25831098.

Mahyari S, Mahyari B, Emami SA, Malaekheh-Nikouei B, Jahanbakhsh SP, Sahebkar A, et al. Evaluation of the efficacy of a polyherbal mouthwash containing *Zingiber officinale*, *Rosmarinus officinalis* and *Calendula officinalis* extracts in patients with gingivitis: A randomized double-blind placebo-controlled trial. *Complement Ther Clin Pract*. 2016 Feb;22:93-8. doi: 10.1016/j.ctcp.2015.12.001. Epub 2015 Dec 10. PubMed PMID: 26850813.

Müller HD, Eick S, Moritz A, Lussi A, Gruber R. Cytotoxicity and Antimicrobial Activity of Oral Rinses *In Vitro*. *Biomed Res Int*. 2017;2017:4019723. doi: 10.1155/2017/4019723. Epub 2017 Mar 19. PubMed PMID: 28401154; PubMed Central PMCID: PMC5376431.

Oliveira JR, de Castro VC, das Graças Figueiredo Vilela P, Camargo SE, Carvalho CA, Jorge AO, et al. Cytotoxicity of Brazilian plant extracts against oral microorganisms of interest to dentistry. *BMC Complement Altern Med*. 2013 Aug 15;13:208. doi: 10.1186/1472-6882-13-208. PubMed PMID: 23945270; PubMed Central PMCID: PMC3751599.

Oliveira JR, de Aguiar Almeida RB, das Graças Figueiredo Vilela P, de Oliveira FE, da Rocha RF, Jorge AO, et al. Control of microorganisms of oral health interest with *Arctium lappa* L. (burdock) extract non-cytotoxic to cell culture of macrophages (RAW 264.7). *Arch Oral Biol*. 2014 Aug;59(8):808-14. doi: 10.1016/j.archoralbio.2014.05.013. Epub 2014 May 13. PubMed PMID: 24863657.

Oliveira JR, de Jesus Viegas D, Martins APR, Carvalho CAT, Soares CP, Camargo SEA, et al. *Thymus vulgaris* L. extract has antimicrobial and anti-inflammatory effects in the absence of cytotoxicity and genotoxicity. *Arch Oral Biol*. 2017a Oct;82:271-279. doi: 10.1016/j.archoralbio.2017.06.031. Epub 2017 Jun 27. PubMed PMID: 28683409.

Oliveira JR, Viegas DJ, Figueira LW, de Oliveira FE, Soares CP, Camargo SEA, et al. Biological activities of *Rosmarinus officinalis* L. (rosemary) extract as analyzed in microorganisms and cells. *Experimental Biology and Medicine*. 2017b;242:625–34. doi: 10.1177/1535370216688571.

Oliveira JR, Belato KK, de Oliveira FE, Jorge AOC, Camargo SEA, de Oliveira LD. Mouthwashes: an in vitro study of their action on microbial biofilms and cytotoxicity to gingival fibroblasts. *Gen Dent*. 2018 Mar-Apr;66(2):28-34. PubMed PMID: 29513232.

Park M, Bae J, Lee DS. Antibacterial activity of [10]-gingerol and [12]-gingerol isolated from ginger rhizome against periodontal bacteria. *Phytother Res*. 2008 Nov;22(11):1446-9. doi: 10.1002/ptr.2473. PubMed PMID: 18814211.

Abdul Qadir M, Shahzadi SK, Bashir A, Munir A, Shahzad S. Evaluation of Phenolic Compounds and Antioxidant and Antimicrobial Activities of Some Common Herbs. *Int J Anal Chem*. 2017;2017:3475738. doi: 10.1155/2017/3475738. Epub 2017 Feb 16. PubMed PMID: 28316626; PubMed Central PMCID: PMC5337800.

Rampogu S, Baek A, Gajula RG, Zeb A, Bavi RS, Kumar R, et al. Ginger (*Zingiber officinale*) phytochemicals-gingerenone-A and shogaol inhibit SaHPPK: molecular docking, molecular dynamics simulations and *in vitro* approaches. *Ann Clin Microbiol Antimicrob*. 2018 Apr 2;17(1):16. doi: 10.1186/s12941-018-0266-9. PubMed PMID: 29609660; PubMed Central PMCID: PMC5879566.

Sharifzadeh A, Shokri H. Antifungal activity of essential oils from Iranian plants against fluconazole-resistant and fluconazole-susceptible *Candida albicans*. *Avicenna J Phytomed*. 2016 Mar-Apr;6(2):215-22. PubMed PMID: 27222835; PubMed Central PMCID: PMC4877960.

Valera MC, Cardoso FG, Maekawa LE, Camargo CH, de Oliveira LD, Carvalho CA. *In vitro* antimicrobial and anti-endotoxin action of *Zingiber officinale* as auxiliary chemical and medicament combined to calcium hydroxide and chlorhexidine. *Acta Odontol Scand*. 2015;73(7):556-61. doi: 10.3109/00016357.2014.949846. Epub 2015 Apr 20. PubMed PMID: 25892281.

Valera MC, Oliveira SA, Maekawa LE, Cardoso FG, Chung A, Silva SF, et al. Action of Chlorhexidine, *Zingiber officinale*, and Calcium Hydroxide on *Candida albicans*, *Enterococcus faecalis*, *Escherichia coli*, and Endotoxin in the Root Canals. *J Contemp Dent Pract*. 2016 Feb 1;17(2):114-8. PubMed PMID: 27206998.

Whaley SG, Berkow EL, Rybak JM, Nishimoto AT, Barker KS, Rogers PD. Azole Antifungal Resistance in *Candida albicans* and Emerging Non-*albicans* *Candida* Species. *Front Microbiol*. 2017 Jan 12;7:2173. doi: 10.3389/fmicb.2016.02173. eCollection 2016. Review. PubMed PMID: 28127295; PubMed Central PMCID: PMC5226953.

World Health Organization - WHO. Global Action Plan on Antimicrobial Resistance. Geneva:OHCHR; 2015. ISBN 978 92 4 150976 3.

ANEXO A – Laudo técnico do extrato glicólico de Zingiber officinale



EXTRATO GLICÓLICO DE GENGIBRE (HG)

Nome Científico: *Zingiber officinalis* Roscoe / Zingiberaceae

INCI: Zingiber Officinalis Extract

Nº CAS: 84696-15-1

Parte Utilizada: Rizoma

Fórmula Molecular: N.A

Peso Molecular: N.A

PRINCÍPIOS ATIVOS

Contem óleos voláteis (1 a 3%), sais minerais, amido, proteínas, gorduras, princípios amargos, ácidos orgânicos, resina.

PROPRIEDADES E EMPREGOS TERAPÊUTICOS

O Extrato Glicólico de Gengibre EXP tem ação: hiperemiante, estimulante da circulação periférica, antiinflamatória.

Poderá ser incorporado em: cremes, loções, géis, máscaras faciais, cremes para massagem e outros produtos cosméticos.

Indicado somente para uso externo em concentração de até 10%.

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

ESTOCAGEM E VALIDADE

Deve ser estocado hermeticamente fechado, ao abrigo da luz solar direta e do calor.

Prazo de validade: 36 meses a partir da data de fabricação.

Obs.:

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

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Alonso, J.R. "Tratado de Fitomedicina". Editora SRL. ISIS, 1998.

Balmé, F.; Plantas Medicinais. Ed. Helmus, 1996.

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

Cruz, G.L. Dicionário das Plantas Úteis do Brasil. 3ª ed., Ed. Civilização Brasileira AS, 1985.

Encyclopédie des Plantes Médicinales. Ed. Larousse-Bordas, 1997.

Segredos Virtudes das Plantas Medicinais. Seleções Reader's Digest, 1983