



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

THAÍS CRISTINE PEREIRA

**EXTRATOS HIDROETANÓLICOS DE CANELA (*Cinnamomum
verum*) e ROMÃ (*Punica granatum* L.) PROMOVEM AÇÃO
ANTIBACTERIANA FRENTE CEPAS RESISTENTES A
ANTIBIÓTICOS DE *Acinetobacter baumannii* e *Pseudomonas
aeruginosa***

THAÍS CRISTINE PEREIRA

**EXTRATOS HIDROETANÓLICOS DE CANELA (*Cinnamomum verum*) e ROMÃ
(*Punica granatum*) PROMOVEM AÇÃO ANTIBACTERIANA FRENTE CEPAS
RESISTENTES A ANTIBIÓTICOS DE *Acinetobacter baumannii* e *Pseudomonas
aeruginosa***

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

Pereira, Thaís Cristine

Extratos hidroetanólicos de canela (*Cinnamomum verum*) e romã (*Punica granatum* L.) promovem ação antibacteriana frente cepas resistentes a antibióticos de *Acinetobacter baumannii* e *Pseudomonas aeruginosa* / Thaís Cristine Pereira. - São José dos Campos : [s.n.], 2023.
98 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.
Orientador: Luciane Dias de Oliveira.

1. *Acinetobacter baumannii*. 2. *Pseudomonas aeruginosa*. 3. *Cinnamomum verum*. 4. *Punica granatum*. 5. Fitoterapia. I. Oliveira, Luciane Dias de, orient. II. Universidade Estadual Paulista (Unesp), Instituto de Ciência e Tecnologia, São José dos Campos. III. Universidade Estadual Paulista 'Júlio de Mesquita Filho' - Unesp. IV. Universidade Estadual Paulista (Unesp). V. Título.

IMPACTO POTENCIAL DESTA PESQUISA

Devido ao aumento de patógenos resistentes a antibióticos e consequentemente a mortalidade causada por infecções oportunistas, a Organização Mundial da Saúde (OMS) divulgou uma lista de agentes críticos prioritários que necessitam de novas alternativas de tratamento, dentre esses estão as bactérias *Acinetobacter baumannii* e *Pseudomonas aeruginosa*. Diante disso, a fitoterapia pode ser uma alternativa promissora devido às suas propriedades medicinais relatadas, tais como, anti-inflamatória, antibacteriana, antibiofilme, antitumoral, entre outras. Analisar o efeito antibacteriano de extratos de plantas é de suma importância e pode futuramente contribuir para novas formulações terapêuticas e/ou integrativas de tratamento. Este estudo demonstra resultados promissores da ação antibacteriana e antibiofilme dos extratos hidroetanólicos de canela e romã frente cepas clínicas de *A. baumannii* e *P. aeruginosa*, bem como uma importante ação antioxidante e ausência de citotoxicidade na faixa de concentração testadas.

POTENTIAL IMPACT OF THIS RESEARCH

Due to the increase in antibiotic-resistant pathogens and consequently the mortality caused by opportunistic infections, the World Health Organization (WHO) released a list of priority critical agents that require new treatment alternatives, among which are the bacteria *Acinetobacter baumannii* and *Pseudomonas aeruginosa*. In view of this, phytotherapy can be a promising alternative due to its reported medicinal properties, such as anti-inflammatory, antibacterial, antibiofilm, antitumor, among others. Analyzing the antibacterial effect of plant extracts is of paramount importance and may in the future contribute to new therapeutic and/or integrative treatment formulations. This study demonstrates promising results of the antibacterial and antibiofilm action of hydroethanolic extracts of cinnamon and pomegranate against clinical strains of *A. baumannii* and *P. aeruginosa*, as well as an important antioxidant action and absence of cytotoxicity in the tested concentration range.

BANCA EXAMINADORA

Profa. Assoc. Luciane Dias de Oliveira (Orientador)

Universidade Estadual Paulista (Unesp)

Instituto de Ciência e Tecnologia

Campus de São José dos Campos

Prof. Dr. Jonatas Rafael de Oliveira

Universidade Anhembi Morumbi

Escola de Medicina

Campus de São José dos Campos

Profa. Dra. Liliana Scorzoni

Universidade Estadual Paulista (Unesp)

Instituto de Ciência e Tecnologia

Campus de São José dos Campos

Profa. Assoc. Andrea Carvalho de Marco

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 José dos Campos

São José dos Campos, 20 de julho de 2023.

DEDICATÓRIA

Dedico essa tese de doutorado a Deus, que me presenteia todos os dias com a energia da vida, que me dá forças e coragem para atingir os meus objetivos.

Aos meus pais, Flávia Regina Pereira e Paulo Henrique de Sousa Pereira, por todo o amor, carinho e dedicação. Agradeço-lhes por tudo que fizeram por mim e por acreditar em meus sonhos.

À minha família, que está comigo em todos os momentos da minha vida. Em especial, aos meus avós maternos e paternos, que me dão carinho e muita sabedoria.

Ao meu noivo, Guilherme Henrique Jesus do Prado, pelo carinho, paciência, motivação e por acreditar em meus sonhos. Tê-lo ao meu lado tornou minha caminhada mais tranquila e me deu forças para seguir em frente.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus por todas as bênçãos, oportunidades em minha vida e por me guiar para a realização dos meus sonhos.

Agradeço aos meus pais: Flávia Pereira e Paulo Pereira, que me educaram da melhor forma e me apoiam em todas as minhas decisões. Obrigada por todas as vezes que se esforçaram embaixo de chuva e sol para que eu pudesse ter uma boa educação. Eu amo vocês e prometo sempre ser o orgulho de vocês.

Agradeço ao meu melhor amigo e agora noivo Guilherme Henrique que é um exemplo de dedicação e garra, que diariamente me ajuda a ser uma pessoa melhor, e está comigo em todos os momentos me inspirando a ir atrás dos meus sonhos.

Agradeço à toda minha família Gomes e Pereira, pelo apoio constante, união e por estar me aplaudindo em todas as minhas conquistas.

Aos meus amigos de graduação e de profissão. Obrigada pela confiança e por momentos maravilhosos.

Aos meus amigos do Laboratório de Microbiologia e Imunologia da Unesp, em especial, Livia, Juliana, Paulo, Patrícia e Evelyn por estarem sempre dispostos a ajudar e pela amizade.

À minha grande amiga Patrícia Nagai, no qual tivemos a oportunidade de realizar vários experimentos juntas e criamos uma grande amizade que será levada para o resto da vida. Obrigada pelo seu companheirismo e por estar comigo nos momentos mais difíceis. Você é muito especial pra mim!

Aos meus amigos do LANA: Vanessa, Raquel, Lucas, Ellen, Geovani e Lara por sempre estar dispostos a ajudar. Vocês são especiais e tornaram meu doutorado mais leve, divertido, produtivo e jamais irei esquecer dos nossos momentos

especiais. Irei sentir muita saudade de todos vocês! Obrigada por tudo e que Deus abençoe cada um de vocês com prosperidade e em todas as conquistas.

A minha amiga Raquel Menezes, que tivemos a oportunidade de fazer mestrado, especialização e doutorado juntas, colecionamos diversos momentos felizes e sempre estávamos apoiando uma à outra em todas as etapas. Obrigada por sua amizade, por toda a ajuda que me deu e por sempre estar presente!

A todos os meus alunos de Iniciação Científica e TCC eu aprendi muito com vocês. O meu doutorado foi mais especial ainda pois tive a oportunidade de orientá-los e aprender muito com a história e produção científica de cada um. Além disso, colecionamos grandes momentos no laboratório, no qual irei levá-los para sempre em meu coração.

Agradeço aos membros da equipe da Seção Técnica de Pós-graduação Sandra, Carolina e Bruno; do Escritório de Apoio à Pesquisa e Internacionalização Carlos Guedes, também ao técnico André e à secretária Carla por sempre estarem dispostos a solucionar nossas dúvidas, com muita paciência, sendo gentis e atenciosos com todos.

A todos os docentes e coordenadores do Instituto de Ciência e Tecnologia (ICT/Unesp) que estão sempre dispostos a ajudar e serem atenciosos com todos os alunos. Vocês são minha inspiração, são excelentes profissionais e pessoas extraordinárias. Obrigada por tudo!

A minha eterna orientadora Liliana Scorzoni, que me orientou no mestrado e me ensinou a ser uma profissional e pessoa melhor, sempre muito dedicada e atenciosa. Uma pessoa que carrega consigo otimismo e uma sabedoria imensa. Sempre disposta a ajudar e orienta seus alunos com muito amor. Tenho um carinho imenso por você e se estou terminando o doutorado é porque você me incentivou e acreditou no meu potencial. Obrigada por tudo! Você sempre estará em meu coração!

A professora Andrea Carvalho de Marco, por toda sua dedicação com os alunos e por nossas parcerias. Obrigada por fazer parte do meu doutorado, sempre te admirei muito. Você é uma pessoa doce, simpática, amorosa e excelente profissional.

Às Professoras Juliana Campos Junqueira, Luana M. R. de Vasconcellos e Marianne Spalding por serem extremamente atenciosas e sempre se mostrando dispostas a me ajudar.

À Professora Vivian Cristina Costa Castilho Hyodo que é a minha inspiração me ensinou muito durante a minha graduação em Ciências Biológicas, um exemplo de profissional e pessoa amorosa com todos. Obrigada por tudo, se hoje estou realizando o sonho de ter doutorado, certamente foi porque você plantou essa semente em mim e acreditou no meu potencial!

Ao professor Jonatas Rafael de Oliveira, que acabei conhecendo por conta dos imensos elogios, todos falavam do seu profissionalismo e por ser uma pessoa de coração bom. Quando o conheci, só confirmei o que todos já diziam. Te admiro muito, obrigada por toda ajuda no doutorado e por fazer parte desse momento especial. Que Deus continue te abençoando, obrigada por tudo!

À Professora Adeline Lacerda Jorjão, que apesar de não ter tido a oportunidade de trabalhar juntas nas pesquisas, sempre ouvi elogios sobre sua competência e se destacou por ser prestativa e excelente docente. Fico muito grata de aceitar fazer parte dessa banca.

À Profa. Dra. Maria Cristina Marcucci Ribeiro, que sempre esteve de prontidão para nos ajudar e ensinar, aprendemos muito. É uma pessoa doce, sábia, animada e nos inspira a ser cada dia melhor. Passamos momentos maravilhosos no LabQ, nos divertimos, comemoramos resultados, enfim... Estou com saudades, espero vê-la em breve!! Obrigada por tudo.

À minha orientadora Profa. Assoc. Luciane Dias de Oliveira, que não consigo nem escrever sem me emocionar. Uma pessoa maravilhosa, inteligente, leve, simpática e

super competente. É uma orientadora exemplar, sempre presente e sábia. Te admiro muito, você é minha inspiração. Obrigada pela excelente orientação, estou saindo do doutorado com o coração cheio de gratidão e agradecendo a Deus por ter colocado uma orientadora tão especial no meu caminho.

Aos alunos, professores e toda a equipe do meu novo emprego. Obrigada a todos das escolas Maria Olímpia e João Leite de Jambuí-SP, que estão torcendo por mim. Vocês apareceram recentemente em minha vida, mas já se tornaram especiais. Obrigada por ser uma excelente equipe e me receberem tão bem.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), pela concessão da Bolsa de doutorado, através do processo nº 140176/2021-7, no período de 01/03/2021 a 31/01/2023.

“Não fui eu que ordenei a você? Seja forte e corajoso! Não se apavore nem desanime, pois o Senhor, o seu Deus, estará com você por onde você andar.”

(Josué 1:9)

RESUMO

Pereira TC. Extratos hidroetanólicos de canela (*Cinnamomum verum*) e romã (*Punica granatum* L.) promovem ação antibacteriana frente cepas resistentes a antibióticos de *Acinetobacter baumannii* e *Pseudomonas aeruginosa* [tese]. São José dos Campos (SP): Universidade Estadual Paulista (Unesp), Instituto de Ciência e Tecnologia; 2023.

A resistência bacteriana tem aumentado progressivamente no mundo, assim, há necessidade de novas opções de tratamentos. A fitoterapia tem ganhado notoriedade para combater infecções, principalmente as causadas por bactérias resistentes aos antibacterianos disponíveis. Diante do exposto, o presente estudo teve como objetivo preparar e analisar a composição fitoquímica e a ação antibacteriana dos extratos hidroetanólicos de canela (EHC) e romã (EHR) isolados e associados frente culturas planctônicas e biofilmes de cepas padrão e clínicas de *Acinetobacter baumannii* e *Pseudomonas aeruginosa*, além disso, analisar a ação citotóxica dos extratos em queratinócitos humanos (HaCat). Para isso, os EHC e EHR foram preparados e quantificado o teor de sólidos solúveis. Posteriormente, foi quantificado o teor de flavonoides e fenóis totais, análise antioxidante por meio da redução do radical 2,2'-difetil-1-picrilhidrazila (DPPH), e a fitoquímica por cromatografia líquida (HPLC). Em relação a ação antibacteriana dos extratos, foi aplicado o teste de microdiluição em caldo (CLSI – M7-A9) e a ação sinérgica realizada por meio do ensaio de *checkerboard*. As concentrações mais efetivas foram analisadas sobre biofilmes em formação (prevenção) e biofilmes formados (tratamento de 24 h), e quantificada a viabilidade por meio do teste colorimétrico MTT. Para avaliar a citotoxicidade, os tratamentos foram aplicados sobre cultura celular de HaCat por 24 h e analisados por meio do teste colorimétrico MTT. A análise estatística foi realizada com 5% de significância ($p < 0.05$), analisados pelo método ANOVA complementado pelo Teste de Tukey. Os resultados demonstraram que os EHC e EHR possuem ação antioxidante e presença de fitocompostos. Os extratos apresentaram ação antibacteriana para todas as cepas avaliadas, quando os mesmos foram associados, obteve-se concentrações sinérgicas para as cepas clínicas de *A. baumannii*. Em relação a ação antibiofilme, o EHC inibiu a formação em 95% e EHR em 96% do biofilme de #Ab 1, enquanto a cepa #Pa 2 teve 92% e 93% de inibição quando em contato com EHC e EHR, respectivamente. Após tratamento de 24 h em biofilmes formados, as reduções da viabilidade foram de 72% para as cepas #Ab 2 e #Ab 3 quando em contato com o EHC, já EHR inibiu em 83% a viabilidade da cepa #Ab ATCC. Para *P. aeruginosa* (#Pa 2), as reduções da viabilidade foram de 84% e 88,5% quando tratados com EHC e EHR, respectivamente. A avaliação da citotoxicidade em HaCat demonstrou que após tratamentos com diferentes concentrações dos extratos a viabilidade celular se manteve acima de 70% em todos os grupos. Diante disso, conclui-se que os EHC e EHR apresentam importante ação antioxidante e antibacteriana, tanto em culturas planctônicas quanto em biofilmes, e não apresentaram efeitos citotóxicos na faixa de concentração testada.

Palavras-chave: *Acinetobacter baumannii*; *Pseudomonas aeruginosa*; *Cinnamomum verum*; *Punica granatum*; Biofilme; Fitoterapia.

ABSTRACT

Pereira TC. Cinnamon (Cinnamomum verum) and pomegranate (Punica granatum L.) hydroethanolic extracts promote antibacterial action against antibiotic-resistant 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.

Bacterial resistance has progressively increased in the world, thus, there is a need for new treatment options. Phytotherapy has gained notoriety for fighting infections, mainly those caused by bacteria resistant to available antibacterials. In view of the above, the present study aimed to prepare and analyze the phytochemical composition and antimicrobial action of hydroethanolic extracts of cinnamon (EHC) and pomegranate (EHR) isolated and associated against planktonic cultures and biofilms of standard and clinical strains of Acinetobacter baumannii and Pseudomonas aeruginosa, in addition, analyze the cytotoxic action of the extracts on human keratinocytes (HaCat). For this, the EHC and EHR were prepared and the soluble solids content was quantified. Subsequently, the content of flavonoids and total phenols, antioxidant analysis through the reduction of the radical 2,2'-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH), and phytochemistry by liquid chromatography (HPLC) were quantified. Regarding the antimicrobial action of the extracts, the broth microdilution test (CLSI – M7-A9) was applied and the synergistic action was performed through the checkerboard test. The most effective concentrations were analyzed on forming biofilms (prevention) and formed biofilms (24 h treatment), and viability was quantified using the MTT colorimetric test. To evaluate the cytotoxicity, the treatments were applied on HaCat cell culture for 24 h and analyzed using the MTT colorimetric test. Statistical analysis was performed with 5% significance ($p < 0.05$), analyzed by the ANOVA method complemented by the Tukey test. The results showed that the EHC and EHR have antioxidant action and presence of phytochemicals. The extracts showed antibacterial action for all evaluated strains, when they were associated, synergistic concentrations were obtained for the clinical strains of *A. baumannii*. Regarding the antibiofilm action, EHC inhibited formation by 95% and EHR by 96% of the #Ab 1 biofilm, while the #Pa 2 strain had 92% and 93% inhibition when in contact with EHC and EHR, respectively. After 24 h treatment in formed biofilms, viability reductions were 72% for strains #Ab 2 and #Ab 3 when in contact with EHC, whereas EHR inhibited the viability of strain #Ab ATCC by 83%. For *P. aeruginosa* (#Pa 2), viability reductions were 84% and 88.5% when treated with EHC and EHR, respectively. The evaluation of cytotoxicity in HaCat showed that after treatments with different concentrations of extracts, cell viability remained above 70% in all groups. Therefore, it is concluded that EHC and EHR have important antioxidant and antibacterial action, both in planktonic cultures and in biofilms, and did not show cytotoxic effects in the tested concentration range.

Keywords: Acinetobacter baumannii; Pseudomonas aeruginosa; Cinnamomum verum; Punica granatum L.; Biofilm; Phytotherapy

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	14
2 REVISÃO DE LITERATURA.....	17
2.1 <i>Acinetobacter baumannii</i> e <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	17
2.2 Fitoterapia	21
2.2.1 Canela (<i>Cinnamomum verum</i>).....	24
2.2.2 Romã (<i>Punica granatum</i> L.)	26
3 PROPOSIÇÃO	29
4 MATERIAL E MÉTODOS.....	30
4.1 Preparação e análise fitoquímica dos extratos.....	30
4.1.1 Determinação do teor de sólidos solúveis.....	31
4.1.2 Avaliação da presença de aldeído cinâmico e punicalagina por HPLC.....	32
4.1.3 Avaliação da atividade supressora de radicais livres dos extratos (atividade antioxidante).....	32
4.1.4 Teor de flavonoides totais nos EHC e EHR.....	34
4.1.4.1 Determinação da curva-padrão expressos em quercetina	34
4.1.4.2 Determinação do teor flavonoides totais dos extratos	35
4.1.5 Teor de fenóis totais dos EHC e EHR	35
4.1.5.1 Determinação da curva-padrão	36
4.1.5.2 Determinação do teor de fenóis totais nos extratos	36
4.2 Atividade antibacteriana dos EHC e EHR.....	37
4.2.1 Bactérias	37
4.2.1.1 Ação antibacteriana dos extratos isolados.....	39
4.2.1.2 Método de microdiluição <i>checkerboard</i> dos extratos associados	41
4.2.1.3 Inibição da formação de biofilme (prevenção) dos extratos isolados e combinados	44
4.2.1.4 Tratamento de biofilmes formados	44
4.2.1.5 Ensaio de MTT para quantificação da viabilidade celular do biofilme....	46
4.3 Testes em culturas de células.....	47
4.3.1 Cultivo celular de queratinócitos humanos (HaCat).....	47
4.3.2 Avaliação da citotoxicidade dos EHC e EHR	48
4.4 Análise estatística	50

5 RESULTADO	51
5.1 Extratos	51
5.1.1 Teor de sólidos solúveis.....	51
5.1.2 Avaliação da composição fitoquímica por HPLC	52
5.1.3 Avaliação da atividade supressora de radicais livres dos extratos (atividade antioxidante).....	53
5.1.4 Determinação do teor flavonoides totais na amostra	54
5.1.5 Determinação do teor fenóis totais na amostra.....	55
5.2 Atividade antibacteriana dos extratos em cultura planctônica	56
5.2.1 Concentração Bactericida Mínima (CBM).....	56
5.2.2 Efeito sinérgicos dos EHC e EHR associados	58
5.3 Atividade antibiofilme dos EHC e EHR isolados e associados frente <i>A. baumannii</i> e <i>P. aeruginosa</i>	60
5.3.1 Inibição da formação de biofilme (prevenção) dos extratos isolados	60
5.3.2 Inibição da formação de biofilme (prevenção) dos extratos associados ..	64
5.3.3 Tratamento (24 h) de biofilmes formados com os extratos isolados.....	66
5.3.4 Tratamento (24 h) de biofilmes formados com os extratos associados....	70
5.4 Citotoxicidade	71
6 DISCUSSÃO	74
7 CONCLUSÃO	80
REFERÊNCIAS.....	81

1 INTRODUÇÃO

A resistência bacteriana aos antibióticos tem aumentado progressivamente no mundo e deve causar mais mortes do que o câncer até 2050. Essa resistência é uma resposta evolutiva das bactérias contra agentes antimicrobianos (Avershina et al., 2021). As bactérias podem ser resistentes intrinsecamente a alguns antibióticos, devido a presença de bombas de efluxo, alterações na parede celular e presença de porinas (Eichenberger, Thaden, 2019). Por outro lado, algumas cepas bacterianas podem ter resistência adquirida, no qual, trata-se de uma cepa que era suscetível a um determinado antibiótico e tornou-se resistente devido a mutações genéticas ou transferências de genes de resistência por meio da conjugação (Eichenberger, Thaden, 2019; Lopatkin et al., 2021).

Em 2019, um relatório divulgado pelo Centro de Controle e Prevenção de Doenças (CDC) dos Estados Unidos afirmou que a era pós-antibiótica já está acontecendo no mundo (CDC, 2019). A Organização Mundial da Saúde (OMS), publicou uma lista de bactérias resistentes prioritárias que necessitam de novos antibióticos, entre essas, estão as espécies *Acinetobacter baumannii* e *Pseudomonas aeruginosa* (Tacconelli, 2018).

Acinetobacter baumannii é uma bactéria Gram-negativa, oportunista, que pode causar uma série de infecções nosocomiais graves, principalmente em pacientes em unidades de terapia intensiva (UTI). Esse patógeno pode causar pneumonia relacionada à ventilação mecânica, infecções da corrente sanguínea, do trato urinário e do sítio cirúrgico (Antunes et al., 2014). Infecções por *A. baumannii* são associadas a baixa disponibilidade de opções terapêuticas e à desinfecção ineficiente de dispositivos hospitalares em conjunto com o descuido de medidas de proteção individual, que levam a uma infecção cruzada (Freitas et al., 2019).

Há relatos da resistência de *A. baumannii* contra diferentes antibióticos, tais como carbapenêmicos (imipenem, doripenem e meropenem) que são fármacos de escolha contra essa espécie. A erradicação de *A. baumannii* resistente a carbapenêmicos é difícil, portanto, é importante encontrar novos tratamentos para controlá-las (Aurilio et al., 2022; Ibrahim et al., 2021; Miyakis et al., 2011). Além da capacidade de resistência aos antibióticos, *A. baumannii* exibe inúmeros fatores de

virulência, entre eles, a secreção de enzimas e toxinas extracelulares, e a capacidade de se agregar em superfícies bióticas ou abióticas, formando os conhecidos biofilmes (Morris et al., 2019; Yang et al., 2019).

Além de *A. baumannii*, outra bactéria citada pela OMS é *Pseudomonas aeruginosa*, um bacilo aeróbio, Gram-negativo, oportunista, pertencente à família Pseudomonadaceae que apresenta resistência intrínseca a vários antibióticos que ocorre devido à baixa permeabilidade da membrana externa, efluxo de antibióticos para fora da célula e a síntese de enzimas que inativam os antibióticos, além de apresentar resistência pela formação de biofilmes e facilidade para troca de material genético entre as células bacterianas (Chevalier et al., 2017; Pang et al., 2019). *P. aeruginosa* é responsável por diversas doenças, desde infecções locais e agudas até sistêmicas e crônicas, que podem ser fatais (Sadikot et al., 2005). A espécie pode ocasionar infecções da corrente sanguínea, respiratórias, e em menor incidência infecções do trato urinário (Pelegrin et al., 2021). Além da capacidade de acometimento em diferentes órgãos humanos, quando há presença de mecanismos de resistência aos antibióticos, essas infecções se tornam mais problemáticas, dificultando o tratamento e representando uma ameaça para populações de pacientes suscetíveis (Pelegrin et al., 2021).

Na literatura, há relatos de resistência antimicrobiana de *P. aeruginosa* a pelo menos um agente em todos, exceto dois ou menos nas mesmas categorias, que são: aminoglicosídeos, cefalosporinas (cefepima e ceftazidima), fluoroquinolonas, penicilinas, monobactâmicos, ácidos fosfônicos, polimixinas (Alnimr, Alamri, 2020; Magiorakos et al., 2021; Morita et al., 2014).

A. baumannii e *P. aeruginosa* pertencem ao grupo ESKAPE (*Enterococcus faecium*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *A. baumannii*, *P. aeruginosa* e *Enterobacter* spp) criado em 2008, no qual é composto por seis bactérias importantes no contexto de infecções relacionadas à assistência à saúde (IRAS) e que apresentam a capacidade de adquirir diversos mecanismos de resistência a antimicrobianos, favorecendo a seleção de cepas multirresistentes (El-Mahallawy et al., 2016; Marturano et al., 2019)

Um dos mecanismos de resistência apresentado por esses patógenos a formação de biofilme (Roy et al., 2018). Biofilme é uma comunidade estruturada de micro-organismos com uma matriz extracelular polimérica aderida a uma superfície

inerte ou viva. Estas estruturas são mais resistentes aos agentes antimicrobianos, desta forma, as concentrações de fármacos precisam ser maiores para que sejam efetivas, podendo ser até quatro vezes maiores que a utilizada para bactérias que não possuem essa multirresistência (Dunne, 2002; Pokharel et al., 2022). Essa resistência a diversos antimicrobianos se dá pela dificuldade de penetração destes na matriz extracelular, bem como pela taxa de crescimento microbiano acelerada e também por mudanças fisiológicas observadas no crescimento do biofilme (Donlan, Costerton, 2002; Pokharel et al., 2022).

Diante da resistência bacteriana aos antibióticos, há necessidade de descobertas de novos tratamentos. Assim, a fitoterapia tem ganhado notoriedade para combater infecções, principalmente as provocadas por bactérias nosocomiais (Masuku et al., 2023; Pavela et al., 2019). Os extratos vegetais têm sido empregados a uma variedade de propósitos devido a suas diversas propriedades, em específico, a atividade antimicrobiana (Al-Mariri, Safi, 2021; Masuku et al., 2023; Vaou et al., 2021).

A ação antimicrobiana de extratos de plantas medicinais tem sido relatada na literatura como um tratamento integrativo, aumentando o arsenal terapêutico disponível, como ação antifúngica, antibacteriana, antiprotozoária e antioxidante (Alviano, Alviano, 2009; Imran et al., 2021; Kumar et al., 2006; Mahlo et al., 2016; Pavela et al., 2019). Os estudos sobre o extrato de canela (*Cinnamomum verum*) demonstraram sua eficácia antifúngica, antimicrobiana, anti-inflamatória, antidiabética, cardioprotetora, antioxidante (Essid et al., 2017; Mathew, Abraham, 2006; Nawaz et al., 2023; Schink et al., 2018). Além da canela, a romã (*Punica granatum* L.) tem se destacado por ser um fruto rico em substâncias biologicamente ativas. Seus extratos possuem propriedades antimicrobianas, antioxidantes, anti-inflamatórias e anticancerígenas (Aparecida et al., 2016; Gharbani et al., 2023; Houston et al., 2017; Modaeinama et al., 2015).

Diante das propriedades terapêuticas dos extratos de canela e romã relatadas na literatura, é de suma importância avaliar a ação antibacteriana desses extratos isolados e associados frente cepas clínicas de *A. baumannii* e *P. aeruginosa*, bem como sua ação antioxidante e citotóxica, para contribuir com o desenvolvimento de futuros produtos terapêuticos antibacterianos que possam ser integrativos no tratamento de infecções causadas por esses patógenos.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 *Acinetobacter baumannii* e *Pseudomonas aeruginosa*

Uma das maiores causas de mortalidade e morbidade no mundo é a prevalência de bactérias que causam infecções nosocomiais, ou seja, aquelas infecções adquiridas em ambiente hospitalar, tais como pneumonia, infecções do trato urinário, incisões cirúrgicas e infecções no sangue (Boev, Kiss, 2017; Sikora, Zahra, 2022). Apesar de protocolos hospitalares elaborados para evitar a contaminação dos pacientes que estão internados em UTIs, o surgimento de cepas resistentes aos antimicrobianos tem aumentado a taxa de infecção nos hospitais dificultando o tratamento (Dhingra et al., 2020; Garzotto et al., 2021).

A resistência bacteriana aos antibióticos comumente utilizados está aumentando progressivamente, estima-se que essa ameaça global deve causar futuramente mais mortes do que todos os cânceres combinados (Avershina et al., 2021). Essa resistência é uma resposta evolutiva dos micro-organismo aos fármacos antimicrobianos inseridos em seu ambiente e se dá por diferentes mecanismos (Avershina et al., 2021; Eichenberger, Thaden, 2019).

Os antibióticos atuam sobre as bactérias inibindo a síntese de parede celular, a replicação do DNA, a síntese de proteínas ou pode causar danos à membrana citoplasmática (Bush, 2012; Khameneh et al., 2019). Porém, com a resistência bacteriana, muitos mecanismos atuam para prejudicar à ação desses fármacos. A resistência intrínseca é presente em algumas bactérias, como por exemplo, reduções da permeabilidade da membrana, bombas de efluxo ativas, modificações na parede celular e presença de porinas; já a resistência adquirida, a bactéria que era sensível torna-se resistente a determinado tipo de antibiótico devido a mutações genéticas ou aquisições de novos genes por meio da conjugação bacteriana (Avershina et al., 2021; Eichenberger, Thaden, 2019).

Quanto a resistência bacteriana, há diferentes definições na literatura. Bactérias multirresistentes (MDR) são definidas como a capacidade de resistir a pelo menos um agente em três ou mais categorias antimicrobianas, já o termo

extensivamente resistente a medicamentos (XDR) é categorizado para bactérias que resistem a pelo menos um agente antimicrobiano em todas as categorias, exceto para duas categorias ou menos. E o termo pan-resistentes (PDR) foi definido como não sensível a todos aos agentes antimicrobianos em todas as categorias (Magiorakos et al., 2011).

O surgimento de cepas resistentes aos antibióticos é natural e faz parte do processo evolutivo, porém tem aumentado progressivamente devido ao uso excessivo e indiscriminado dos mesmos, além disso, o tratamento inadequado de águas residuais e a falta de saneamento básico contribuem para disseminação (Larsson, Flach, 2022).

A vencedora do prêmio Nobel de química, Ada Yonath, alertou sobre a criação de novos antibióticos, e justificou que caso não ocorra, a resistência bacteriana causará mortes de pessoas aos 50 e 60 anos como antigamente (El País, 2019). Segundo a Organização Mundial da Saúde (OMS), há agentes patogênicos prioritários (críticos) que necessitam de pesquisas e desenvolvimentos de novos antibióticos para combater a crescente resistência antibacteriana, entre esses patógenos estão *Acinetobacter baumannii* e *Pseudomonas aeruginosa* (Tacconelli, 2018).

A. baumannii é um cocobacilo Gram-negativo, aeróbio, não fermentador, não fastidioso, catalase positiva e oxidase negativa, imóvel e oportunista, que pertence à família Moraxellaceae (Peleg et al., 2008). Essa espécie causa infecções nosocomiais, com incidência mais elevada em UTIs e em indivíduos imunocomprometidos (Munoz-Price, Weinstein, 2008; Silva-Boghossian et al., 2013). Essas infecções são diversas e podem incluir pneumonia hospitalar e associada à ventilação mecânica, infecções do trato urinário, meningite, bacteremia e infecções gastrointestinais e de pele/ferida. Os isolados de *A. baumannii* multirresistente estão associados à história médica de longas internações hospitalares, presença de cateteres e ventilação mecânica, enquanto hospedeiros imunocomprometidos e gravemente doentes predispõem a infecções invasivas (Kyriakidis et al., 2021).

Esta espécie é altamente resistente à diversas classes de antibióticos (carbapenêmicos, beta-lactâmicos, tetraciclina, fluoroquinolonas e aminoglicosídeos) considerados de primeira linha (Fournier et al., 2008). Os carbapenêmicos foram o tratamento de escolha das infecções multirresistentes

por *A. baumannii* (MDR), mas seu uso prévio e excessivo levou ao aumento da incidência de resistência aos mesmos (Nordmann, Poirel, 2019).

Uma das características mais importantes de *A. baumannii* é a sua plasticidade genética, facilitando mutações e rearranjos genéticos rápidos, bem como a integração de determinantes estranhos transportados por elementos genéticos móveis (Vrancianu et al., 2020). Além disso, possui a capacidade de formar biofilmes, ou seja, aderir a superfícies abióticas e/ou bióticas, exibindo maior resistência antimicrobiana. Pensando nessa resistência, pesquisas científicas têm sido publicadas a fim de propor novas alternativas ou estratégias de tratamento para infecções causadas por *A. baumannii*, dentre essas, fitoterapia utilizando extratos de plantas medicinais (AlBalawi et al., 2023; Nogbou et al., 2022), combinações de antibióticos e nanopartículas (Banoub et al., 2021), desenvolvimentos de vacinas (Singh et al., 2022), peptídeos antimicrobianos (Jaśkiewicz et al., 2019).

Outra espécie bacteriana, citada pela OMS (2017), como agente prioritário para o desenvolvimento de novos antibióticos, foi *P. aeruginosa*. Esse patógeno é um bacilo Gram-negativo, pertence à família Pseudomonadaceae, é móvel, não fermentativo, oxidase positivo, e amplamente presente na natureza (Erdal et al., 2020). A espécie é considerada oportunista, acometendo principalmente os indivíduos imunocomprometidos, e está altamente associada a infecções nosocomiais, como a pneumonia relacionada com ventilação mecânica, infecções da corrente sanguínea e infecções de pele e tecidos moles (Pang et al., 2019; Thaden et al., 2017). *P. aeruginosa* é uma das principais causas de mortalidade e morbidade nesses pacientes hospitalizados (Barbier et al., 2013; Bassetti et al., 2018; Pang et al., 2019) e apresenta resistência intrínseca a vários antibióticos que ocorre devido à baixa permeabilidade da membrana externa, efluxo de antibióticos e a síntese de enzimas que inativam os antibióticos, além de apresentar resistência adquirida por transferência horizontal de genes de resistência ou mutações genéticas. A formação de biofilmes faz parte da resistência adaptativa, podendo formar-se em pulmões de pacientes infectados, dificultando o tratamento por formar uma barreira de difusão capaz de dificultar à ação dos antibióticos às células bacterianas (Breidenstein et al., 2011; Drenkard, 2003; Pang et al., 2019).

P. aeruginosa exibe resistência a diversos antibióticos, tais como, aminoglicosídeos, quinolonas e β -lactâmicos (Hancock, Speert, 2000). Assim,

pesquisas têm demonstrado novos antibióticos ou estratégias terapêuticas integrativas para o tratamento desse patógeno resistente. Dentre elas, estão peptídeos antimicrobianos (Aoki, Ueda, 2013; Chen et al., 2022), nanopartículas (Wang et al., 2017), estratégias vacinais (Priebe, Goldberg, 2014; Sousa et al., 2021), fagoterapia (Vandenheuvel et al., 2015), fitoterapia (Gavanji et al., 2023; Santos et al., 2020), entre outras (Pang et al., 2019).

A. baumannii e *P. aeruginosa* fazem parte do grupo de bactérias multirresistentes ESKAPE (Rice, 2008) e que apresentam a capacidade de adquirir diversos mecanismos de resistência a antimicrobianos, favorecendo a seleção de cepas multirresistentes, sendo um dos mecanismos de resistência apresentado por esses patógenos a formação de biofilme, como citado anteriormente.

Os biofilmes são formados por bactérias aderidas à uma superfície, podendo esta ser biótica ou abiótica, cercadas por matriz extracelular polimérica autoproduzida constituída por polissacarídeos, proteínas e materiais genéticos, que formam uma estrutura complexa (Costerton, Stewart, 1999). As células se comunicam por moléculas de sinalização (ou seja, detecção de *quórum*), induzindo os micro-organismos do biofilme a alterarem os padrões de expressão gênica (Preda, Săndulescu, 2019). No geral, o processo de adesão bacteriana é dividido em dois estágios: acoplamento e condicionamento de superfície, e fase secundária que é a de bloqueio. A partir desses dois estágios de adesão do biofilme, inicia-se o processo de maturação. Nesse processo, as bactérias ligadas à superfície começam a se replicar ativamente e seus componentes extracelulares irão interagir com moléculas orgânicas e inorgânicas para criação do glicocálice, quando o biofilme é formado em dispositivos médicos, as proteínas do paciente (fibrinogênio, fibronectina, glicosaminoglicanos) auxiliam na formação de biofilmes maduros e resistentes (Dunne, 2002).

A formação de biofilme dificulta o tratamento uma vez que apresenta maior resistência aos antimicrobianos do que quando comparado com células planctônicas (Hill et al., 2022). As concentrações de fármacos podem ser até quatro vezes maiores do que as bactérias que não possuem essa capacidade (Dunne, 2002). Essa resistência se dá pela dificuldade de penetração de agentes antimicrobianos na matriz extracelular, taxa de crescimento microbiano acelerada e mudanças fisiológicas devido ao crescimento do biofilme (Donlan, Costerton, 2002). Diante da

resistência microbiana e a dificuldade no tratamento, estudos têm demonstrado diferentes alternativas para minimizar essa problemática (Dolatabadi et al., 2018; Hill et al., 2022). Hill et al. (2022) demonstraram em seu estudo estratégias utilizando peptídeos antimicrobianos para prevenção e erradicação da infecção ocasionada por biofilmes formados em dispositivos ortopédicos. Os extratos de plantas também têm demonstrado importante ação antibiofilme contra bactérias resistentes, como relatado por Dolatabadi et al. (2018) que avaliaram essa ação sobre isolados clínicos de *P. aeruginosa* utilizando o extrato de *Juglans regia* L. Os autores consideraram uma alternativa para o controle de infecções relacionadas ao biofilme desse patógeno.

Sabendo da problemática da resistência bacteriana aos antibióticos e a necessidade de novas estratégias de tratamentos, não só para culturas planctônicas, mas também quando organizados em biofilmes, tornam-se necessários os estudos envolvendo essa temática para o desenvolvimento futuro de novas opções terapêuticas/integrativas.

2.2 Fitoterapia

Fitoterapia é um campo da medicina integrativa que utiliza ativos de plantas ou derivados vegetais para prevenir ou tratar doenças (Kim, 2012). O uso tradicional de fitoterápicos geralmente preserva a composição original e integridade da planta de origem, de modo que toda a planta ou uma porcentagem desejada de seus componentes minimamente adulterados, é utilizado para fins medicinais (Falzon, Balabanova, 2017).

As propriedades terapêuticas de plantas estão descritas na literatura e demonstram ter eficácia quando preparadas e utilizadas em formas de chás, óleos essenciais, cápsulas e extratos (aquosos, hidroetanólicos, metanólicos, entre outros) (Marjanović-Balaban et al., 2018; Marques et al., 2017; Santos et al., 2021; Zhao et al., 2022). Os solventes (etanol, água, metanol, etc.) utilizados na extração dos extratos possuem polaridade distintas, assim, é possível extrair compostos diferentes. Solventes e solutos com valores similares de polaridade terão melhor

desempenho no processo de extração (Zhang et al., 2018). O processo de extração possui melhor eficácia quando ocorre similaridade e intermiscibilidade entre solvente e soluto (Zhang et al., 2018). O solvente metanol possui a capacidade de extrair mais compostos bioativos quando comparado ao etanol, já o solvente etanol permite a extração de componentes solúveis em água ou óleo, quanto maior a relação solvente/soluto, maior o rendimento da extração (Babbar et al., 2014; Zhang et al., 2018). A água é eficiente no processo de extração de moléculas polares e quando misturada com etanol é mais eficiente na extração de polifenóis (Lim et al., 2019; Petkovska et al., 2016).

A eficácia terapêutica de plantas e suas formulações tem sido relatada em todo o mundo (Amsterdam et al., 2009; Geng et al., 2010; Kritis et al., 2020). Amsterdam et al. (2009) estudaram a erva camomila (*Matricaria recutita*) e concluíram que a mesma possui flavonoides que modulam vias de neurotransmissores, promovendo assim, um controle da ansiedade, depressão e insônia. A planta *Ginseng*, por sua vez, demonstrou ter efeito benéfico para cognição, memória e comportamento (Geng et al., 2010). A nanoencapsulação de extrato de semente de toranja e óleo de canela mostrou ser uma técnica promissora para a saúde bucal, atuando efetivamente sobre bactérias presentes na cavidade oral (*Streptococcus mutans* e *S. sobrinus*) (Choi et al., 2023).

O uso de fitoterápicos também ganhou notoriedade na prevenção e tratamento de doença causada pelo coronavírus (COVID-19), Kritis et al. (2020) demonstraram que a combinação de bromelina e curcumina resultou em efeito sinérgico pois a bromelina possui ação anti-inflamatória, atua na coagulação e aumenta substancialmente a absorção de curcumina. A curcumina impede a entrada do SARS-CoV-2 nas células, evitando assim, a replicação viral. Oliveira et al. (2022) demonstraram por meio de revisão de literatura a ação antiviral de produtos medicinais derivados de plantas contra SARS-CoV-2, os extratos das plantas *Andrographis paniculata*, *Artemisia annua*, *Artemisia afra*, *Cannabis sativa*, *Curcuma longa*, *Echinacea purpurea*, *Olea europaea*, *Piper nigrum*, e *Punica granatum*) e fitocompostos derivados de plantas medicinais (artemisininas, glicirrizina e compostos fenólicos) demonstraram impedir a entrada do vírus às células hospedeiras e sua replicação viral, além de demonstrarem importante efeito imunomodulador.

Muitas plantas possuem potentes efeitos antimicrobianos, e por isso os estudos envolvendo diferentes micro-organismos e extratos vegetais estão crescendo cada vez mais (Dubale et al., 2023; Marjanović-Balaban et al., 2018; Santos et al., 2021). A própolis verde brasileira, além da sua ação anti-inflamatória citada anteriormente, também possui uma importante ação antimicrobiana em cultura planctônica e biofilmes de cepas bacterianas multirresistentes, tais como *P. aeruginosa* e *K. pneumoniae* (Santos et al., 2021). Além de extratos de plantas, os óleos essenciais também se destacam por sua potente ação antimicrobiana, o óleo de tomilho foi ativo para *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae* e *Brachyspira hyodysenteriae*; já o óleo de hortelã-pimenta com maior teor de mentol possui efeito antimicrobiano sobre *Escherichia coli*, *P. aeruginosa*, *Salmonella enterica*, *Listeria monocytogenes* e *S. aureus* (Marjanović-Balaban et al., 2018). Extratos de plantas da Etiópia demonstraram ação antimicrobiana contra *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* e *Candida albicans*, os autores sugerem que essa ação se dá pela presença de metabólitos secundários de diferentes classes de compostos (Dubale et al., 2023).

Essas propriedades terapêuticas presentes em plantas são devido a presença de constituintes fitoquímicos, tais como flavonoides, fenóis, alcaloides, taninos, glicosídeos, saponinas e terpenóides (Amsterdam et al., 2009; Dubale et al., 2023; Talib, Mahasneh, 2010). Estudos demonstraram a presença desses fitocompostos em extratos brutos de canela, alho, manjerição, curry, gengibre, sálvia, mostarda no qual apresentaram ação antimicrobiana contra bactérias Gram-positivas e Gram-negativas (Alzoreky, Nakahara, 2003; Castro et al., 2008). No estudo com plantas medicinais da Etiópia também foi demonstrado importante ação antimicrobiana, e os autores atribuíram essa ação à presença de metabólitos secundários de diferentes classes de compostos (flavonoides, alcaloides, glicosídeos, fenóis, saponinas, esteroides e terpenóides, sendo os flavonoides, alcaloides e fenóis os mais abundantes) (Dubale et al., 2023).

Apesar dos estudos envolvendo os efeitos terapêuticos e o conhecimento popular da ação de plantas, a investigação de seu potencial citotóxico é de suma importância para que as mesmas possam ser utilizadas com segurança. Ensaio de citotoxicidade são realizados para medir a capacidade dos compostos causar danos ou morte celular, para isso, diferentes linhagens celulares são utilizadas em estudos,

entre essas estão: fibroblastos, células HeLa, pneumócitos, queratinócitos humanos, entre outras (Li et al., 2015; Wiegand, Hipler, 2009). A linhagem de queratinócitos humanos (HaCat) é a primeira linha celular epitelial humana que exibe diferenciação normal e tem sido amplamente utilizada para pesquisas na área da saúde (Boukamp et al., 1988; Wilson, 2014). Estudos de citotoxicidade de plantas utilizando ensaios *in vitro* com HaCat tem sido reportado na literatura (Silva et al., 2021; Wijesinghe et al., 2021). O óleo essencial de *Mentha piperita* L. teve suas propriedades antioxidantes, antibacterianas e citotóxicas estudadas, em relação a citotoxicidade a maior concentração de óleo essencial (100 µg/ml) resultou na viabilidade de aproximadamente 90% de células HaCaT, demonstrando propriedades não citotóxicas (Silva et al., 2021). Outro estudo de citotoxicidade em HaCat demonstrou que o óleo de canela também não apresentou toxicidade em nenhuma concentração testada (0-1000 mg/mL), indicando a natureza não tóxica do tratamento em células humanas (Wijesinghe et al., 2021).

A potente ação terapêutica de diversos extratos de plantas desperta a curiosidade de investigar suas ações antibacterianas em culturas planctônicas e biofilmes, antioxidante e citotóxica. Assim, os extratos de plantas podem se tornar uma alternativa ou auxiliar o esquema terapêutico já existente, principalmente em bactérias resistentes que necessitam de novos compostos, contribuindo, assim, para o sucesso do tratamento.

2.2.1 Canela (*Cinnamomum verum*)

Canela pertence à família Lauraceae, a casca da árvore de canela (obtida de várias árvores do gênero *Cinnamomum*) é uma das especiarias mais populares no mundo, além de também ser conhecida por conta de seus efeitos medicinais (Aggarwal et al., 2022; Mutlu et al., 2023; Pasupuleti et al., 2014).

A canela possui constituintes fitoquímicos, tais como, cinamaldeído, ácido cinâmico, cinamato, procianidinas e catequinas (Yeh et al., 2013). Esses compostos possuem ação antioxidante, anti-inflamatória, antidiabético, antimicrobiano,

anticancerígeno, e atua contra distúrbios neurológicos (Aggarwal et al., 2022; Lee et al., 2013; Matan et al., 2006; Mutlu et al., 2023; Pagliari et al., 2023; Peterson et al., 2009).

Há relatos na literatura de sua importante ação antimicrobiana, tanto de óleos vegetais quanto extratos (Choi et al., 2023; Elcocks et al., 2020; Julianti et al., 2017; Lu et al., 2021; Salma et al., 2019). Propriedades bactericidas do óleo essencial de casca de canela contra cepas de *P. aeruginosa* foram avaliadas e demonstraram que o óleo possui amplo espectro contra a espécie, capaz de eliminar rapidamente o patógeno utilizando concentrações baixas (Elcocks et al., 2020). O extrato etanólico isolado de canela demonstrou ter atividade antimicrobiana potente contra *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli* (Salma et al., 2019). Essa ação também foi observada contra *Vibrio parahaemolyticus* e *E. coli* em outro estudo (Lu et al., 2021). Os efeitos sobre o biofilme de *V. parahaemolyticus* chegou a 93,36% de erradicação e para *E. coli* a taxa de inibição chegou a 48,18%. O estudo concluiu que o extrato de canela é eficaz tanto para prevenir a formação quanto para erradicar biofilmes maduros (Lu et al., 2021).

A ação antimicrobiana da canela está correlacionada com a danificação da membrana celular, alteração do perfil lipídico, inibição ATPases, divisão celular, porinas de membrana, motilidade e formação de biofilme. Em adição, de seus constituintes, tais como cinamaldeído e o ácido cinâmico, ocasionam ação contra bactérias patogênicas Gram-positivas e Gram-negativas. A quantidade e a presença de cada composto variam dependendo da parte da planta (Rao, Gan, 2014). Existem componentes menores (metoxicinamaldeído, cumarina, acetato de cinamila e benzaldeído) que demonstram baixo efeito antimicrobiano quando sozinhos, porém quando estão em combinação com outros constituintes podem apresentar efeito sinérgico ou aditivo contra células bacterianas (Bassolé, Juliani, 2012; Chang et al., 2001; Vasconcelos et al., 2018). O efeito sinérgico é considerado quando a combinação de duas ou mais substâncias produzem uma ação maior do que a soma dos efeitos de cada composto isolado, e é considerada aditiva quando dois ou mais produtos possuem o efeito total igual aos compostos isolados, geralmente isso ocorre quando possuem semelhança química estrutural (Roell et al., 2017). Esse efeito aditivo foi identificado após a combinação do extrato etanólico de casca de canela com o mel contra as bactérias *Propionibacterium acnes* e *Staphylococcus*

epidermidis que são as principais bactérias da pele que causam a formação de acne (Julianti et al., 2017)

Em relação ao potencial antioxidante de canela, há relatos na literatura com resultados promissores (Denkova-Kostova et al., 2020; Pagliari et al., 2023). As suas propriedades fitoquímicas e biológicas foram estudadas pelo ensaio de eliminação de radicais (2,2-difenil-1-picrilhidrazil) DPPH, e os resultados demonstraram ação antioxidante para o óleo essencial de canela (Denkova-Kostova et al., 2020). O extrato aquoso de casca de canela também apresentou importante ação antioxidante e anti-inflamatória após simulação de digestão *in vitro*, mantendo essa ação a nível celular após digestão (Pagliari et al., 2023). A citotoxicidade do óleo de canela foi investigada por Leber et al. (2017) e em concentrações eficazes contra *Solobacterium moorei*, manteve a viabilidade de queratinócitos gengivais após 1 hora de exposição (Leber et al., 2017).

Esses relatos na literatura demonstram diferentes propriedades terapêuticas de canela e a importância de se investigar essas propriedades em diferentes micro-organismos, dispostos em cultura planctônica e biofilmes, bem como sua ação antioxidante e citotóxica para contribuir no desenvolvimento de futuros compostos.

2.2.2 Romã (*Punica granatum* L.)

Romã (*P. granatum* L.) é um arbusto decíduo, pertence à família Punicaceae nativa do Irã, porém atualmente se encontra no mundo todo (Al-Said et al., 2009). Além do uso da fruta, *P. granatum* tem sido alvo de pesquisas por conta das suas propriedades medicinais (de Lima et al., 2021; Shaygannia et al., 2015; Trabelsi et al., 2020). Há relatos que a fruta tem ação antioxidante, anti-inflamatória e antimicrobiana, além disso tem ganhado notoriedade por sua ação antitumoral e antimetastático (Saparbekova et al., 2023; Sharma et al., 2022; Trabelsi et al., 2020).

Os constituintes fitoquímicos presentes em partes da fruta de romã incluem principalmente, ácidos orgânicos, polifenóis, flavonoides, antocianinas, ácidos graxos, alcaloides (Zarfeshany et al., 2014). Antocianinas são compostos que

induzem a coloração marcante presente nas romãs, porém a proporção e tipo depende dos lugares cultivados (Ozkan, 2002). Já a presença de flavonoides e taninos é capaz de impedir o crescimento de células do câncer (Singh et al., 2002), e os compostos fenólicos (punicalagina, punicalina, ácido gálico, ácido elágico e antocianinas) demonstraram ter forte ação antioxidante (punicalagina, punicalina, ácido gálico, ácido elágico e antocianinas) sendo punicalagina capaz de controlar o superóxido e os radicais livres de DPPH (Gil et al., 2000; Shaygannia et al., 2015). Já os ácidos elágico e gálico, presentes na casca da romã, tem ação antiviral e antioxidante.

A ação antimicrobiana da romã tem sido reportada na literatura (Dey et al., 2015; Trabelsi et al., 2020). Dey et al. (2015) demonstraram que o extrato metanol/água da casca de romã e seus constituintes isolados foram ativos contra *Mycobacterium tuberculosis* e *Klebsiella pneumoniae* produtoras de β -lactamases. Trabelsi et al. (2020) avaliaram a ação antimicrobiana de diferentes extratos (hexano, clorofórmio, acetato de etila, etanol e aquosos) das folhas de *P. granatum*. Os resultados demonstraram que os taninos, flavonoides e ácidos fenólicos encontrados nas folhas da romã possuem ação antimicrobiana contra cepas padrão e resistentes de *S. aureus* e *E. coli* resistentes a penicilina. Nesse estudo foi realizado também a combinação dos extratos da folha de romã com antibióticos (amoxicilina e cefotaxima) e obtiveram os melhores resultados sinérgicos contra as cepas mencionadas (Trabelsi et al., 2020). Extratos aquosos e etanólicos de casca de romã foram testados contra *Listeria monocytogenes*, *Salmonella enteric*, *S. typhimurium*, *Chromobacterium violaceum* e *Candida tropicalis* utilizando a técnica de microdiluição em caldo, e concluíram que extrato aquoso é uma melhor fonte de compostos fenólicos com atividade antioxidante do que o extrato etanólico, e possui ação antimicrobiana contra *L. monocytogenes* e *S. Typhimurium*, além de inibir efetivamente o sistema de detecção de *quórum* de *C. violaceum* (Jalali et al., 2021).

Em relação a sua ação antioxidante, o extrato bruto de folhas de *P. granatum* foram analisados e os autores concluíram que o mesmo possui potente ação antioxidante, além disso, a combinação dos extratos com antibióticos resultou ação sinérgica contra bactérias Gram-positivas (de Lima et al., 2021). O suco de romã também mostrou ter ação antioxidante contra o estresse oxidativo induzido pela leishmaniose cutânea em camundongos, os autores concluíram que *P.*

granatum mostra alta e rápida ação contra leishmaniose provavelmente por aumentar a atividade antioxidante endógena (Alkathiri et al., 2017). O efeito antioxidante da romã marroquina também foi investigado, o extrato demonstrou ser rico em punicalagina atuou contra o estresse oxidativo. Os ensaios de eliminação de radicais livres DPPH, poder redutor (FRAP), branqueamento de β -caroteno e eliminação de peróxido de hidrogênio revelaram uma maior atividade dose-dependente do extrato fenólico de casca de romã em comparação com o extrato fenólico de arilo de romã (cobertura carnuda de sementes, parte comestível da planta) (Benchagra et al., 2021). Em relação a citotoxicidade, o extrato de romã quando testado em queratinócitos humanos demonstrou ter concentrações seguras (25 e 50 $\mu\text{g/mL}$) apoiando sua utilização como cosmecêuticos naturais (Liu et al., 2019). Em contrapartida, a ação citotóxica de *P. granatum* foi analisada em linhagem celular de câncer de próstata humano, e o extrato etanólico atenuou a proliferação destas *in vitro* e induziu a apoptose destas, demonstrando ação citotóxica. Sendo, portanto, uma forma alternativa para o controle de linhagem celular da próstata humana (Sineh et al., 2012). Diante desses relatos, mais estudos sobre a citotoxicidade de *P. granatum* são necessários para que possam ser utilizadas em doses seguras.

Como pode ser observado na literatura, a ação terapêutica de canela e romã é conhecida popularmente e apresenta relevância científica, entretanto, os estudos publicados envolvendo os extratos hidroetanólicos isolados e combinados ainda são escassos na literatura. É de suma importância avaliar o efeito desses extratos frente bactérias resistentes a antibióticos, tanto em cultura planctônica quanto em biofilmes, bem como analisar a sua citotoxicidade para que futuramente o uso isolado ou combinado desses extratos possa se tornar um coadjuvante ou integrativo eficaz para o tratamento de infecções causadas por esses patógenos resistentes.

3 PROPOSIÇÃO

Os objetivos desse estudo são:

- a) Preparar os extratos hidroetanólicos de canela (*Cinnamomum verum*) e romã (*Punica granatum*), e analisar a atividade antioxidante e a presença de fitocompostos.
- b) Avaliar a ação antibacteriana dos extratos hidroetanólicos de canela (EHC) e romã (EHR) isolados e associados frente culturas planctônicas e biofilmes de cepas padrão e clínicas de *Acinetobacter baumannii* e *Pseudomonas aeruginosa*.
- c) Analisar a citotoxicidade dos extratos em queratinócitos humanos (HaCat).

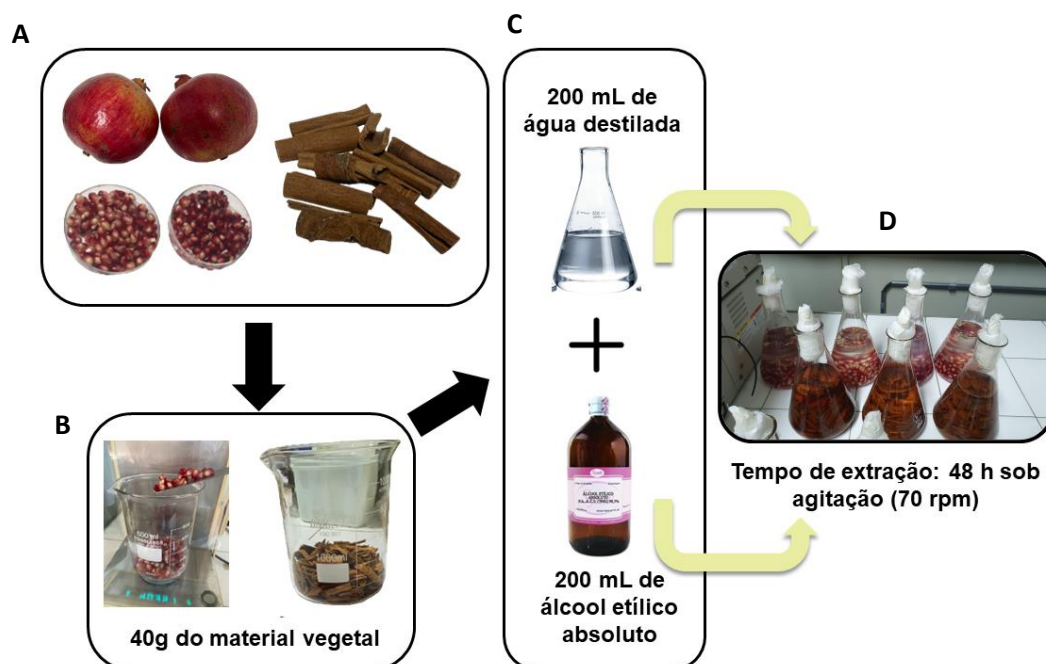
4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Preparação e análise fitoquímica dos extratos

EHC e EHR foram preparados e analisados sob a supervisão da Profa. Dra. Maria Cristina Marcucci Ribeiro, que é docente colaboradora do Programa de Pós-graduação em Ciências Aplicadas à Saúde Bucal (CASB). O EHR foi obtido a partir das sementes da fruta e o de EHC utilizando-se a casca da árvore (canela em pau).

Para a obtenção dos extratos, 40 g do material vegetal adquirido comercialmente, foram colocados em 400 mL de solução hidroetanólica - EH (50% água destilada e 50% álcool etílico absoluto - Synth, Diadema-SP, Brasil) durante 48 h sob agitação (70 rpm, COLEMAN, TS-2000A VDRL Shaker, Brasil) (Figura 1). Posteriormente, os extratos foram filtrados utilizando-se papel filtro quantitativo (J. Prolab, São José dos Pinhais- PR, Brasil) e estocados em frasco âmbar, devidamente rotulados.

Figura 1 – Extração dos EHC e EHR



Legenda: [A] aquisição do material vegetal; [B] pesagem das sementes de romã e da canela em pau; [C] adição dos veículos de extração (água e álcool etílico absoluto) ao material vegetal pesado; [D] incubação.

Fonte: Elaborado pelo autor.

4.1.1 Determinação do teor de sólidos solúveis

Para a quantificação do teor de sólidos solúveis (TSS), 5 mL de cada extrato foram colocados em béqueres previamente pesados (em triplicata) e incubados em estufa de secagem (60°C) (Fanem LTDA, São Paulo-SP, Brasil) até a secagem total. Após, foram realizadas pesagens dos extratos secos para obtenção do TSS em porcentagem, de acordo com a equação abaixo:

$$\% \text{ m/V} = \frac{(m-b) \cdot 100}{V_o}$$

Onde: % m/V é o teor de sólidos solúveis; (m – b) é massa do béquer com o extrato (m) - a massa do béquer sem o extrato (b); **V_o** é o volume de extrato utilizado para análise de sólidos solúveis.

4.1.2 Avaliação da presença de aldeído cinâmico e punicalagina por HPLC

A análise fitoquímica dos extratos foi realizada no Laboratório de Química de Produtos Naturais (LabQ) do Instituto de Ciência e Tecnologia ICT-Unesp de São José dos Campos - SP, sob a supervisão da Profa. Dra. Maria Cristina Marcucci Ribeiro. A determinação do conteúdo de marcadores nos EHC (aldeído cinâmico) e EHR (punicalagina) foi feita por HPLC-DAD, da Merck-Hitachi (Darsmtadt, Alemanha) modelo D-7000 com injetor automático. As condições cromatográficas foram, fase móvel: ácido fórmico (PA, Merck) diluído a 5 % em água ultrapura (solvente A) e metanol de grau cromatográfico - Merck (solvente B). O fluxo foi de 1 mL / min, utilizando-se um gradiente linear. Para o EHC, foi realizada uma corrida cromatográfica de 50 min e volume de injeção da amostra de 20 µL. Os comprimentos de onda de detecção, foram 280 e 340 nm (Veiga et al., 2017). Foi feita uma curva de calibração com o marcador aldeído cinâmico, entre 4,0 a 10,0 µg/mL para a quantificação do mesmo no EHC. Para o EHR, foi realizada uma corrida cromatográfica de 45 min e volume de injeção da amostra de 20 µL. Os comprimentos de onda de detecção foram de 280 nm e 340 nm.

4.1.3 Avaliação da atividade supressora de radicais livres dos extratos (atividade antioxidante)

Este método tem por base a redução do radical 2,2'-difênil-1-picrilhidrazila (DPPH, Sigma-Aldrich, St Louis, Missouri, EUA) em solução de álcool etílico absoluto, o qual apresenta o máximo de absorção na faixa de 515- 528 nm. Ao fixar um Hidrogênio, abstraído ao antioxidante em estudo, observa-se uma diminuição na absorbância, o que permite calcular após estabelecimento do equilíbrio da reação, a quantidade de antioxidante gasta para reduzir 50% do DPPH• (CE₅₀ que é a concentração do extrato capaz de eliminar 50% dos radicais livres) (Veiga et al., 2017; Bueno et al., 2022). Para isso, os extratos foram diluídos a 1% V/V, e posteriormente, foi preparada uma diluição a 0,01% V/V. Em 11 tubos de ensaio,

numerando-os de 0 até 10, foram adicionados (1000, 960, 920, 880, 840, 800, 760, 720, 680, 640, 600) μL de álcool respectivamente em cada tubo de ensaio. Em seguida, sobre o álcool foram acrescentados 0, 40, 80, 120, 160, 200, 240, 280, 320, 360, 400 μL de extrato a 0,01%.

O tubo nº 0, foi o controle (100% de DPPH sem os extratos). Nele foram adicionados 1000 μL de DPPH. Após 60 segundos, o DPPH foi adicionado aos demais tubos a cada 1 minuto. Com isso, a leitura no espectrofotômetro (Micronal B582, São Paulo, Brasil) foi realizada após 30 min da adição do DPPH no tubo 0. Quando uma determinada substância que age como doador de átomos de hidrogênio é adicionada a uma solução de DPPH, a hidrazina é obtida com mudança simultânea na coloração de púrpura a amarelo pálido (Alves et al., 2010). Diante disso, a leitura é realizada utilizando o comprimento de onda de 517 nm (Figura 2). Após a realização da cinética de descoloração, foi construído um gráfico do percentual de DPPH restante calculada por planilha de cálculo, *versus* a concentração do extrato ($\mu\text{g/mL}$) e calculada a CE_{50} (concentração que elimina 50% dos radicais livres), através do método dos mínimos quadrados.

Figura 2 - Cinética de descoloração para avaliar a atividade antioxidante



Legenda: Os tubos de ensaio receberam diferentes concentrações de álcool etílico, extratos a 0,01% e a cada 1 min acrescentados 1000 μ L DPPH. Após 30 min de incubação, foi realizada leituras da cinética de descoloração em espectrofotômetro a 517 nm.

Fonte: Elaborado pelo autor.

4.1.4 Teor de flavonoides totais nos EHC e EHR

4.1.4.1 Determinação da curva-padrão expressos em quercetina

Para a determinação da curva-padrão, foi preparada uma solução estoque de quercetina (Sigma-Aldrich, St Louis, Missouri, Estados Unidos) em metanol (Synth, Diadema-SP, Brasil). Para isso, os seguintes reagentes foram preparados: solução de cloreto de alumínio (AlCl_3 , Dinâmica LTDA, Indaiatuba-SP, Brasil) a 5% em água destilada e solução metanólica de quercetina 1 mg/mL.

Foi construído uma curva padrão utilizando-se soluções metanólicas de quercetina em concentrações de 3 a 12,0 μ g/mL. Transferiu-se para um balão volumétrico de 10 mL calibrado, contendo aproximadamente 5 mL de metanol, uma alíquota correspondente a cada concentração de quercetina e 200 μ L da solução de

AlCl_3 . O volume final foi acertado a 15°C e agitado por 5 segundos. Decorrido o tempo de 30 min, foi realizada a leitura em espectrofotômetro a 425 nm. A equação da curva padrão (absorbância *versus* concentração de quercetina em $\mu\text{g/mL}$) foi calculada pelo método dos mínimos quadrados.

4.1.4.2 Determinação do teor flavonoides totais dos extratos

Para a determinação do teor de flavonoides totais dos extratos, foi preparada uma solução estoque de 100 μL do extrato (cuja concentração de sólidos solúveis foi determinada previamente como descrito no item 4.1.1) em um balão volumétrico de 10 mL onde se acrescentou metanol até completar o menisco (solução estoque). O procedimento a partir deste ponto foi realizado em triplicata.

Foram pipetados 200 μL desta solução estoque em um balão de 10 mL contendo aproximadamente 5 mL de metanol. Em seguida, foi acrescentado 200 μL da solução de AlCl_3 a 5%. Foi completado o volume do balão com metanol até próximo do menisco e agitado por 5 segundos. Posteriormente, a solução foi colocada no banho-maria por 30 min a 20°C .

Após este período, o menisco foi acertado e realizada a leitura da absorbância em 425 nm utilizando um espectrofotômetro (B582, Micronal, São Paulo, Brasil). A concentração de flavonoides totais expressos em quercetina foi calculada utilizando-se a equação da reta da curva-padrão, pela planilha de cálculo (Apêndice B).

4.1.5 Teor de fenóis totais dos EHC e EHR

A determinação do teor de fenóis totais foi baseada no método de Folin – Ciocalteau (Dinâmica LTDA, Indaiatuba-SP, Brasil). Esta técnica emprega este reagente que complexa com um fenol, dando uma reação colorida, que pode ser medida pelo valor da absorbância a 760 nm (Marcucci et al., 2021).

4.1.5.1 Determinação da curva-padrão

Foi construída uma curva-padrão a partir da solução estoque 1 mg/mL de ácido gálico (Sigma-Aldrich, St Louis, Missouri, Estados Unidos) em 10 mL de água. As concentrações da curva estão na faixa de 3 a 12 µg/mL.

Foi transferida para um balão volumétrico de 10 mL com 5 mL de água destilada uma alíquota correspondente a cada concentração da solução de ácido gálico e 800 µL do reagente Folin – Ciocalteau (Dinâmica LTDA, Indaiatuba-SP, Brasil). A solução foi agitada por alguns segundos e no intervalo de 1 a 8 min foram acrescentados 1,2 mL da solução de carbonato de sódio (Dinâmica LTDA, Indaiatuba-SP, Brasil) a 20%, pH = 12, deixando-se reagir em banho maria na temperatura de 20°C. Decorrido o tempo de 2 h, foi realizado o acerto do volume final, e a solução foi agitada por 5 segundos. A leitura foi realizada em espectrofotômetro a um comprimento de onda de 760 nm. Calculou-se a equação da curva-padrão (absorbância *versus* concentração de ácido gálico em µg/mL) pelo método dos mínimos quadrados.

4.1.5.2 Determinação do teor de fenóis totais nos extratos

Para determinação do teor de fenóis totais, 1 mL de cada um dos extratos, foi transferido para um balão volumétrico de 100 mL, dissolvido 10 mL de álcool etílico absoluto e completado o volume com água destilada de forma lenta e sob agitação para obtenção da solução estoque (10 mg/mL). O procedimento a partir deste ponto foi realizado em triplicata.

Uma alíquota de 200 µL foi transferida para um balão volumétrico de 10 mL (1:50) contendo aproximadamente 5 mL de água destilada e adicionados 800 µL do reagente Folin – Ciocalteau. Posteriormente, foi realizada uma agitação durante 5 segundos e no intervalo de 1 a 8 min e acrescentados 1,2 mL da solução de tampão carbonato de sódio a 20%. O volume foi completado com água até próximo ao

menisco e a solução foi mantida em um banho-maria a 20°C. Decorrido o tempo de 2 h, o menisco foi acertado até o volume final à temperatura ambiente, agitando-se por 5 segundos, e realizada a leitura em 760 nm (em espectrofotômetro). A concentração de fenóis totais expressos em ácido gálico, foi calculada utilizando-se a equação da reta da curva padrão, pela planilha de cálculo.

4.2 Atividade antibacteriana dos EHC e EHR

4.2.1 Bactérias

Foram utilizadas amostras clínicas multirresistentes de *A. baumannii* e *P. aeruginosa* (quadro 1), 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 por meio do sistema automatizado MicroSCAN AutoSCAN 4® (quadros 2 e 3). Foi avaliada também a ação dos extratos em cepas de referência (*A. baumannii* ATCC 19606 e *P. aeruginosa* ATCC 15442), fornecidas pelo Laboratório de Microbiologia e Imunologia do Instituto de Ciência e Tecnologia (ICT - Unesp de São José dos Campos).

Quadro 1 – Cepas utilizadas nesse estudo

<i>Acinetobacter baumannii</i>	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
#Ab 1	#Pa 1
#Ab 2	#Pa 2
#Ab 3	#Pa 3
#Ab 4	#Pa 4
ATCC 19606	ATCC 15442

Fonte: Elaborado pelo autor.

Quadro 2 - Perfil de resistência a antibióticos de cepas clínicas de *A. baumannii*

Antibióticos	Cepas clínicas de <i>A. baumannii</i>			
	#Ab 1	#Ab 2	#Ab 3	#Ab 4
Ertapenem	R	R	R	R
Imipenem	R	R	R	R
Meropenem	R	R	R	R
	Cepa padrão de <i>A. baumannii</i> ATCC 19606			
Ampicilina	Resistente			
Estreptomicina	Resistente			
Espectinomicina	Resistente			
Cloranfenicol	Resistente			
Sulfametoxazol	Resistente			

Legenda: R: Resistente.

Fonte: Os dados referentes as cepas clínicas foram fornecidos pelo Laboratório Bioclin do grupo Policlin, São José dos Campos – SP. Os dados informados sobre a cepa padrão Ab ATCC 196006 foram obtidos por meio de publicação científica (Hamidian et al., 2020).

Quadro 3 - Perfil de resistência a antibióticos de cepas clínicas de *P. aeruginosa*

Antibióticos	Cepas clínicas de <i>P. aeruginosa</i>			
	#Pa 1	#Pa 2	#Pa 3	#Pa 4
Amicacina	S	S	S	R
Cefepima	I	I	I	R
Ceftazidima	I	I	I	R
Ciprofloxacina	I	R	I	R
Colistina	-	-	-	-
Imipenem	I	I	I	R
Levofloxacina	I	R	I	R
Meropenem	S	S	S	R
Piperacilina – Tazobactam	I	I	I	R

Legenda: S - Sensível; I - Intermediário; R - Resistente; - Não avaliado.

Fonte: Dados fornecidos pelo Laboratório Bioclin do grupo Policlin, São José dos Campos – SP

4.2.1.1 Ação antibacteriana dos extratos isolados

Para a determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM) e da Concentração Bactericida Mínima (CBM) de cada extrato para as cepas bacterianas, foi utilizado o método de microdiluição em caldo, preconizado pelo *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI), norma M7-A9. Os EHC e EHR foram esterilizados por meio de filtração utilizando filtros para seringa membrana K18-230 (0.22 µm, 30 mm) (KASVI, China). O teste de microdiluição em caldo foi realizado em microplacas de 96 poços, onde foram adicionados 100 µL de meio de cultura

Mueller Hinton (HiMedia®) e 100 µL dos extratos no primeiro poço da microplaca, de onde partiram uma série de 10 diluições seriadas, como demonstrado no Quadro 4.

Quadro 4 – Diluição dos extratos (mg/mL) para determinação de CIM e CBM

Concentrações dos extratos de canela e romã em microdiluição										
Extratos	1º	2º	3º	4º	5º	6º	7º	8º	9º	10º
EHC	6,6	3,3	1,6	0,8	0,4	0,2	0,1	0,05	0,02	0,01
EHR	6,1	3,0	1,5	0,7	0,3	0,1	0,09	0,04	0,02	0,01

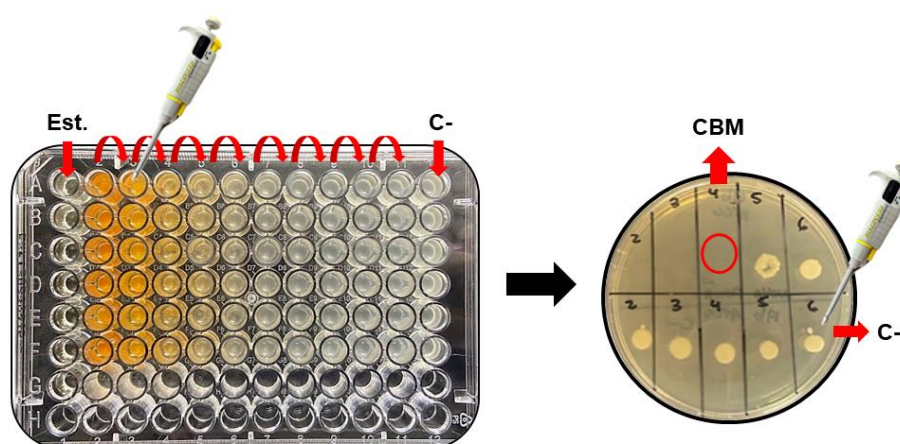
Fonte: Elaborado pelo autor.

Após a preparação das microplacas com os extratos, os micro-organismos reativados em placas contendo ágar *Brain Heart Infusion* (BHI - Himédia) foram padronizados. Em solução salina NaCl 0,9% estéril a suspensão foi padronizada em espectrofotômetro (Micronal B582, São Paulo, Brasil) com comprimento de onda de 625 nm e densidade óptica de $0,08 \pm 0,01$ (aproximadamente 10^8 UFC/mL) da qual se fez diluições para obter 10^6 UFC/mL, conforme recomendações da CLSI (M7-A9). Alíquotas de 100 µL de cada suspensão microbiana, padronizada a 10^6 UFC/mL, foram adicionadas em todos os poços. O veículo de extração hidroetanólico (50% água e 50% álcool etílico absoluto) também foi avaliado para assegurar que o mesmo não possuísse atividade antibacteriana. Como controles de esterilidade, na fileira 1 da placa de microdiluição foi colocado somente o meio de cultura, e os extratos foram semeados em ágar BHI para garantia esterilidade. O controle negativo foi realizado na fileira 12 com meio de cultura e micro-organismo sem tratamento. As microplacas com os extratos e inóculos, e o ágar BHI contendo os extratos (teste de esterilidade) foram incubados por 24 h a 37°C. A CIM foi determinada no último poço da microplaca que não apresentou turvações que indicassem crescimento microbiano. Os testes foram realizados em duplicata e com duas repetições independentes.

Para que a Concentração Bactericida Mínima (CBM) dos extratos fosse determinada, foram semeados 5 μL de todos os poços em ágar BHI. Após incubação a 37°C por 48 h, foi avaliado o crescimento de colônias, a CBM foi determinada na menor concentração semeada onde não houve crescimento de colônias.

O ensaio de microdiluição em caldo para determinação da CIM e CBM dos EHC e EHR está demonstrado na Figura 3.

Figura 3 – Determinação da CIM e CBM dos extratos



Legenda: [A] Ensaio de microdiluição em caldo para determinação da CIM dos extratos de canela e romã; [B] Concentração bactericida mínima (CBM).

Fonte: Elaborado pelo autor.

4.2.1.2 Método de microdiluição *checkerboard* dos extratos associados

O efeito sinérgico das associações de extratos foi avaliado pela técnica *checkerboard* (tabuleiro de xadrez), de acordo com Fratini et al. (2017), Usjak et al. (2019) e Pereira et al. (2021). A técnica é baseada no teste de sensibilidade por microdiluição em caldo, e determina o tipo de interação entre os extratos em: sinérgico, antagônico ou indiferente. Foi utilizado como meio de cultura caldo *Mueller Hinton*. Para as combinações dos extratos, foram utilizados como referência os valores de CBM previamente obtidos seguindo diluições em base 2 (Fratini et al., 2017; Ušjak et al., 2019). Para tanto, 50 μL de caldo *Mueller Hinton* foram

adicionados em todos os poços da microplaca, e posteriormente, adicionados 50 µL das diluições do extrato 1 (EHC) no eixo x (horizontal) da microplaca enquanto 50 µL das diluições do extrato 2 (EHR) foram adicionados no eixo y (vertical) da microplaca, totalizando 100 µL em todos os poços, obtendo, assim, todas as combinações possíveis entre as concentrações dos extratos previamente preparadas, como pode ser observado na Figura 4.

Figura 4 - Diferentes combinações dos EHC e EHR pelo ensaio *checkerboard*

		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	C-	3,3 3,0	3,3 1,53	3,3 0,76	3,3 0,38	3,3 0,19	3,3 0,09	3,3 0,04	3,3 0,02	3,3 0,01	3,3 0,005	6,6	
B	C-	1,6 3,0	1,6 1,53	1,6 0,76	1,6 0,38	1,6 0,19	1,6 0,09	1,6 0,04	1,6 0,02	1,6 0,01	1,6 0,005	3,3	
C	C-	0,82 3,0	0,82 1,53	0,82 0,76	0,82 0,38	0,82 0,19	0,82 0,09	0,82 0,04	0,82 0,02	0,82 0,01	0,82 0,005	1,65	
D	C-	0,41 3,0	0,41 1,53	0,41 0,76	0,41 0,38	0,41 0,19	0,41 0,09	0,41 0,04	0,41 0,02	0,41 0,01	0,41 0,005	0,82	
E	Est.	0,20 3,0	0,20 1,53	0,20 0,76	0,20 0,38	0,20 0,19	0,20 0,09	0,20 0,04	0,20 0,02	0,20 0,01	0,20 0,005	0,41	
F	Est.	0,10 3,0	0,10 1,53	0,10 0,76	0,10 0,38	0,10 0,19	0,10 0,09	0,10 0,04	0,10 0,02	0,10 0,01	0,10 0,005	0,20	
G	Est.	0,05 3,0	0,05 1,53	0,05 0,76	0,05 0,38	0,05 0,19	0,05 0,09	0,05 0,04	0,05 0,02	0,05 0,01	0,05 0,005	0,10	
H	Est.	6,1	3,0	1,53	0,76	0,38	0,19	0,09	0,04	0,02	0,01	0,05	

R O M ã

C A N E L A

Legenda: C- Controle negativo; Est – controle de esterilidade. Todas as concentrações estão expressas em mg/mL.

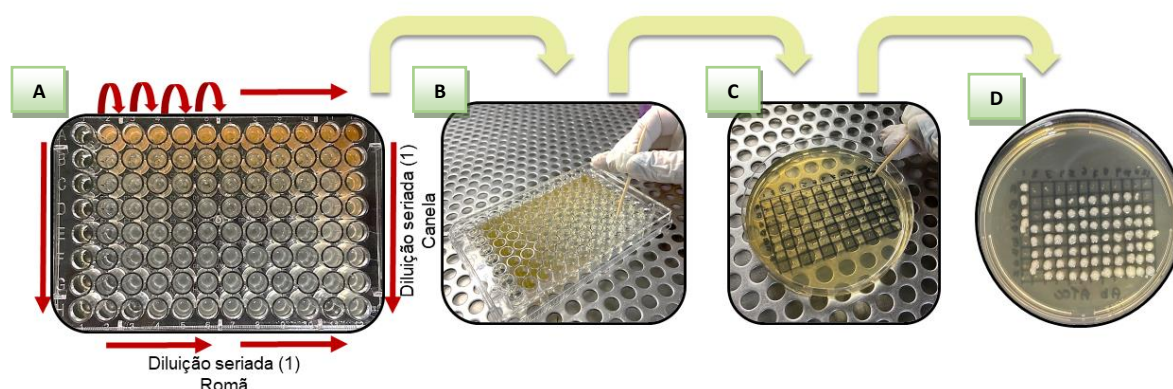
Fonte: Elaborado pelo autor.

Em seguida, foram adicionados 100 µL de inóculo bacteriano, padronizado em 10^6 UFC/mL, totalizando volume de 200 µL em cada poço, exceto no controle de esterilidade que recebeu apenas caldo *Mueller Hinton*. As placas foram incubadas a 37°C por 24 h, posteriormente, foram identificados os poços que não apresentaram crescimento microbiano por meio da ausência de turbidez (Figura 5).

Para avaliar o efeito sinérgico dos extratos, foi adotado o índice de concentração bactericida fracionária (ICBF), que classifica as combinações em

sinérgicas (ICBF $\leq 0,5$), aditivas (ICBF $>0,5$ e $\leq 1,0$), indiferentes (ICBF >1 e ≤ 4) ou antagônicas (ICBF > 4). Para isso, foi semeada em ágar BHI uma alíquota de cada um dos poços da microplaca utilizando haste estéril. As placas foram incubadas por 24 h e foi determinada ICBF de acordo com a ausência de crescimento microbiano nas placas (Figura 5).

Figura 5 – Etapas do ensaio de *checkerboard* “tabuleiro de xadrez”



Legenda: [A] microdiluição em caldo dos extratos associados para determinação da ação sinérgica; [B] alíquota retirada de cada um dos poços da placa após período de incubação e transferidas para o [C] ágar BHI para determinação do índice de concentração bactericida fracionária (ICBF); [D] observação da ausência de colônias para realizar o cálculo para identificação do ICBF.

Fonte: Elaborado pelo autor.

O ICBF foi calculado por meio da soma da concentração bactericida fracionada (CBF) do extrato 1 (canela) mais a CBF do extrato 2 (romã). Uma combinação é considerada sinérgica a uma ICBF $\leq 0,5$, aditiva quando ICBF é $>0,5$ e $\leq 1,0$, indiferente quando ICBF > 1 e ≤ 4 e antagonista em ICBF $> 4,0$. A ICBF pode ser definida como:

$$\frac{\text{CBM combinada (EHC)}}{\text{CBM isolada (EHC)}} + \frac{\text{CBM combinada (EHR)}}{\text{CBM isolada (EHR)}}$$

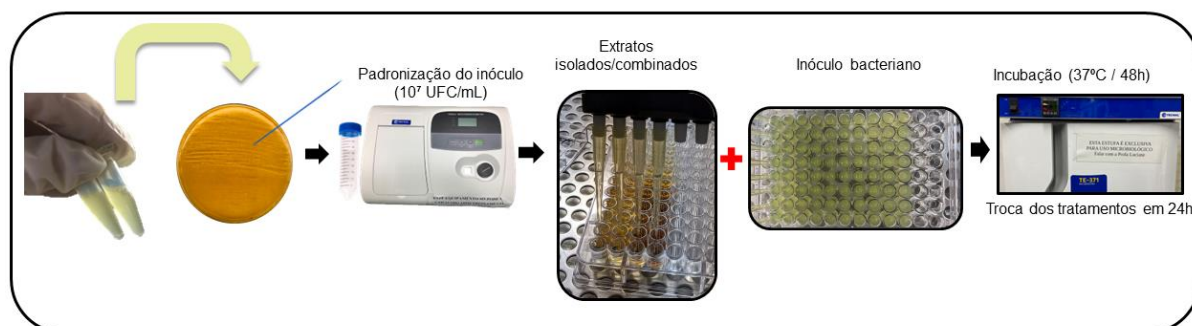
Para os próximos ensaios, foram eleitas três combinações sinérgicas.

4.2.1.3 Inibição da formação de biofilme (prevenção) dos extratos isolados e combinados

Foram colocados, em todos os poços das microplacas, 100 μ L das CBM pré-determinadas ou concentrações sinérgicas dos extratos de romã e canela. Para isso, os extratos foram diluídos em caldo BHI nas concentrações desejadas. Posteriormente, foi preparado o inóculo de cada cepa bacteriana, onde colônias foram diluídas em solução fisiológica estéril (NaCl 0,9%), seguido pela padronização em espectrofotômetro (B582, Micronal, São Paulo, Brasil) obtendo a concentração de 10^7 UFC/mL. Foram adicionados 100 μ L das suspensões padronizadas aos poços contendo as CBM pré-determinadas e as concentrações sinérgicas (Figura 6). Como controle negativo, foi utilizado o caldo BHI e o inóculo, e o controle positivo a solução de clorexidina (0,03%).

As placas foram incubadas à 37°C por 48 h, sendo os tratamentos trocados após 24 h de incubação (Figura 6).

Figura 6 – Etapas do ensaio de inibição da formação de biofilme (prevenção)



Fonte: Elaborado pelo autor.

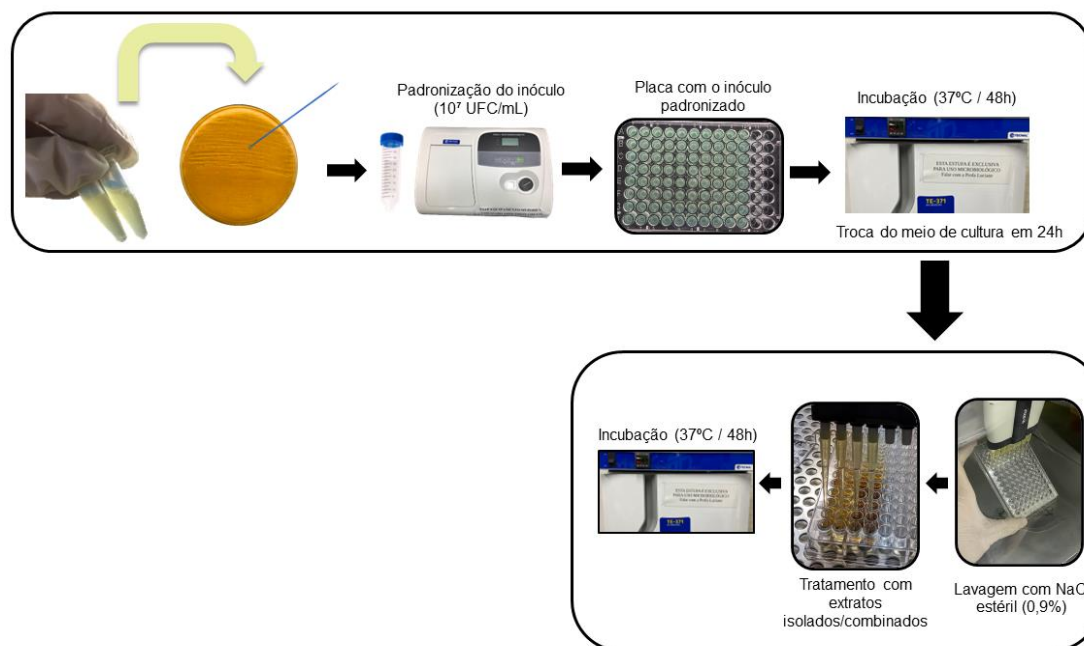
4.2.1.4 Tratamento de biofilmes formados

Os biofilmes foram formados no fundo de microplacas de 96 poços. Nestes poços foram adicionados 100 μ L de caldo BHI e 100 μ L inóculo a 10^7 UFC/mL

preparado em solução fisiológica estéril (NaCl 0,9%). Os biofilmes foram incubados por 48 h, com troca do meio de cultura após 24 h.

Passado o período de formação de biofilme, estes foram colocados em contato com os tratamentos e controles por 24 h em experimentos independentes e em diferentes placas para cada tipo de teste. A microplaca foi dividida em grupos com $n = 10$ para cada tratamento com os extratos isolados (CBM, CBM x 2, CBM x 4) e extratos associados (combinações sinérgicas eleitas) (Figura 7). Como controle positivo foi utilizada a solução de clorexidina a 0,06%, e controle negativo o caldo BHI juntamente com o inóculo. Após os tratamentos, as soluções foram descartadas e o biofilme foi lavado com caldo BHI duas vezes antes de serem realizados os ensaios descritos a seguir (Figura 7).

Figura 7 - Etapas do tratamento do biofilme formado



Fonte: Elaborado pelo autor.

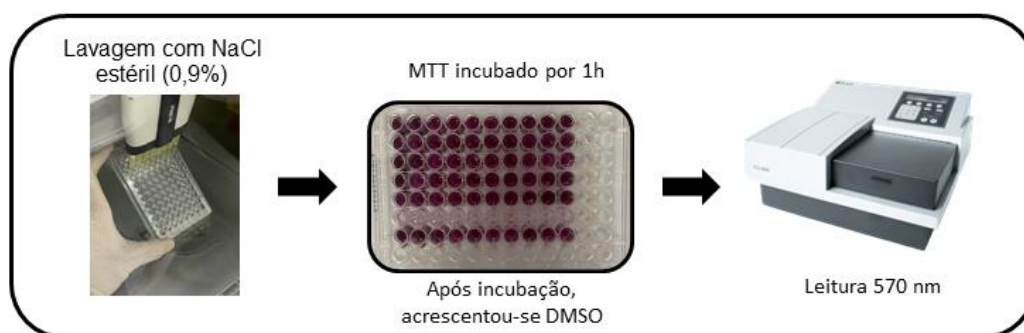
4.2.1.5 Ensaio de MTT para quantificação da viabilidade celular do biofilme

Após o período de incubação do biofilme com os tratamentos, os poços foram lavados com solução fisiológica estéril (NaCl 0,9%) e foi realizado o teste de viabilidade celular do biofilme utilizando solução de MTT (3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-Diphenyltetrazolium Bromide) (Sigma-Aldrich, St Louis, Missouri, Estados Unidos). Para isso, foram adicionados 100 μL da solução de MTT (0,5 mg/mL) em cada poço e a placa foi incubada ao abrigo da luz por 1 h em estufa a 37°C , passado o período de incubação foi retirada a solução e foram adicionados 100 μL de dimetilsufóxido (DMSO) (Synth, Diadema-SP, Brasil) (Figura 8). A placa foi novamente incubada ao abrigo da luz em estufa a 37°C por 10 min e colocada no *shaker* sob agitação constante por 10 min. Posteriormente, a placa foi lida em leitora de microplaca a 570 nm (Figura 8), e as densidades ópticas obtidas foram

convertidas, por meio da fórmula abaixo, em percentual de redução de viabilidade do micro-organismo:

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

Figura 8 – Ensaio de MTT para quantificação da viabilidade celular do biofilme



Legenda: Após o período de incubação do biofilme com os tratamentos (extratos), os mesmos foram lavados com NaCl estéril (0,9%) e aplicado o reagente MTT. Após 1 h de incubação, o MTT foi retirado e acrescentado DMSO em todos os poços. Posteriormente, foi realizada a leitura a 570 nm.
Fonte: Elaborado pelo autor.

4.3 Testes em culturas de células

4.3.1 Cultivo celular de queratinócitos humanos (HaCat)

Foi realizada a análise da atividade citotóxica dos extratos hidroetanólicos de canela e romã sobre as linhagens de queratinócitos humanos (HaCat).

A cultura de Queratinócitos Humanos (HaCaT), foi adquirida do Banco de Células do Rio de Janeiro - Associação Técnico Científica Paul Ehrlich (APABCAM – RJ) e cultivada 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 mantida em frascos

de cultivo celular (TPP, Suíça) incubada em estufa à temperatura de 37°C, com umidade atmosférica, com 5% de CO₂. O meio de cultura foi trocado a cada 48 h e ao atingir o estado de subconfluência das células, caracterizado pela ocupação de mais de 70% do frasco, as mesmas foram utilizadas nos testes. Para tanto, a monocamada de células foi desagregada do assoalho do frasco de cultura com Tripsina com Edta 0,25% (Gibco, Grand Island, Nova York). As células suspendidas foram centrifugadas por 5 min a 3000 rpm, posteriormente, o sobrenadante foi descartado e acrescentado meio de cultivo fresco.

Para a quantificação do número de células viáveis, foi realizado o teste de exclusão pelo azul de *Trypan*. Para isso, alíquotas de 10 e 50 µL da suspensão de células foram misturadas a 90 e 50 µL, respectivamente, ao corante azul de *Trypan*, obtendo as diluições 1/2 e 1/10 e o número de células viáveis foi quantificado pela contagem em câmara de *Neubauer*.

4.3.2 Avaliação da citotoxicidade dos EHC e EHR

A avaliação da citotoxicidade dos EHC e EHR foi realizada por meio do teste colorimétrico MTT analisando a atividade metabólica celular, após contato com os extratos por 24 h. Para tanto, foram utilizadas culturas de queratinócitos humanos (HaCaT). Em microplacas de 96 poços foram adicionados 100 µL de meio DMEM + 10% SFB contendo 4×10^4 células viáveis. Estas placas foram incubadas (37°C com 5% de CO₂) por 24 h para a aderência celular. Passado o tempo de incubação, o sobrenadante foi descartado e as células foram expostas a diferentes concentrações dos extratos isolados: EHC (13,2-0,02 mg/mL), EHR (12,2-0,02 mg/mL) e 10 concentrações associadas (EHC 6,6-0,01 mg/mL + EHR 6,1-0,01 mg/mL), como pode ser observado na figura 9.

Figura 9 – Placa de 96 poços contendo diferentes concentrações dos extratos diluídos em meio DMEM



Fonte: Elaborado pelo autor.

Como grupos controles foram utilizados meio DMEM suplementado com 10% SFB ou salina estéril (NaCl 0,9%) e concentrações do veículo hidroetanólico (50% água e 50% álcool etílico absoluto). Foi utilizado $n=8$ para todos os grupos. Posteriormente, os tratamentos foram descartados e os poços foram lavados com NaCl 0,9% para a retirada de células mortas. Em seguida, as placas foram encaminhadas para verificação da atividade metabólica da cultura, pelo teste colorimétrico MTT. O MTT foi diluído na concentração de 0,5 mg/mL em meio DMEM suplementado com 10% SFB e foram adicionados 100 μ L/poço da solução, seguido pela incubação das placas (37°C, com 5% de CO₂) por 4 h, ao abrigo da luz. Após incubação, a solução de MTT foi retirada e adicionada DMSO pelo tempo de 10 min e realizada a leitura com o auxílio de uma leitora de microplacas com comprimento de onda de 570 nm. As densidades ópticas (DO) obtidas foram convertidas em percentual de viabilidade celular empregando-se a seguinte fórmula:

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

4.4 Análise estatística

Os dados obtidos apresentaram distribuição normal e foram analisados estatisticamente pelo método ANOVA complementado pelo Teste de *Tukey* ($p \leq 0,05$), utilizando o software *GraphPad Prism* 5.0.

5 RESULTADO

5.1 Extratos

5.1.1 Teor de sólidos solúveis

A quantificação do teor de sólidos solúveis (TSS) dos EHC e EHR está demonstrada na tabela 1. O TSS indica a quantidade de substâncias solúveis no solvente de extração hidroetanólico (EtOH:H₂O), determinando-se, assim, a concentração final do extrato vegetal.

Tabela 1 - Teor de sólidos solúveis dos EHC e EHR

Partes da planta	Solvente de extração	TSS (mg/mL)	DP
Casca (canela em pau)	EtOH:H ₂ O (50:50)	26,440	1,0638
Sementes (romã)	EtOH:H ₂ O (50:50)	24,587	0,0802

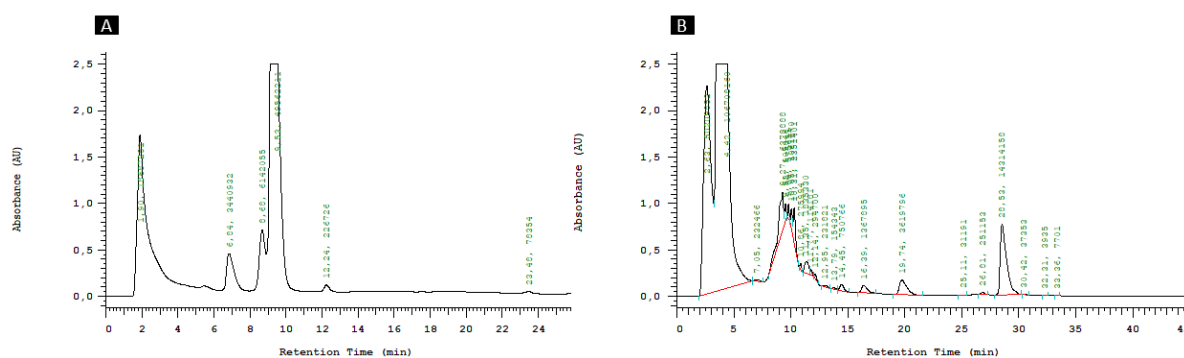
Legenda: EtOH - álcool etílico absoluto); H₂O – água destilada; TSS – Teor de sólidos solúveis; DP - desvio padrão de três determinações.

Fonte: Elaborado pelo autor.

5.1.2 Avaliação da composição fitoquímica por HPLC

A análise cromatográfica por HPLC mostrou picos de aldeído cinâmico no EHC, como mostra a figura 10A. Em relação ao EHR, a punicalagina foi quantificada, sendo uma mistura (do padrão) de α -punicalagina e β -punicalagina, as quais foram quantificadas separadamente (Figura 10B).

Figura 10 - Cromatogramas dos EHC e EHR



Legenda: [A] cromatograma do extrato hidroetanólico de canela (EHC), com o tempo de retenção do aldeído cinâmico de ~9,5 min; [B] cromatograma do extrato hidroetanólico de romã (EHR), o tempo de retenção da α -punicalagina é de ~6,5 min e da β -punicalagina, de ~9,5 min.

Fonte: Elaborado pelo autor.

A tabela 2 mostra o teor de aldeído cinâmico no EHC e o de α -punicalagina e β -punicalagina do EHR, calculados pela equação da curva de calibração dos padrões.

Tabela 2 - Teor de aldeído cinâmico e punicalagina no EHC e EHR, calculado pela equação da curva de calibração do padrão

Extratos (EtOH:H₂O)	mg/mL	% (m/V)
Canela - Teor de aldeído cinâmico	0,771	0,077
Romã - α- punicalagina	2,246	0,225
Romã - β- punicalagina	3,490	0,349

Fonte: Elaborado pelo autor.

5.1.3 Avaliação da atividade supressora de radicais livres dos extratos (atividade antioxidante)

A atividade antioxidante dos extratos hidroetanólicos de canela e romã estão demonstrados na tabela 3. A concentração que elimina 50% dos radicais livres (CE₅₀) foi de 9,11 µg/mL e 27,02 µg/mL para os extratos de canela e romã, respectivamente.

Tabela 3 - Avaliação da atividade antioxidante dos EHC e EHR

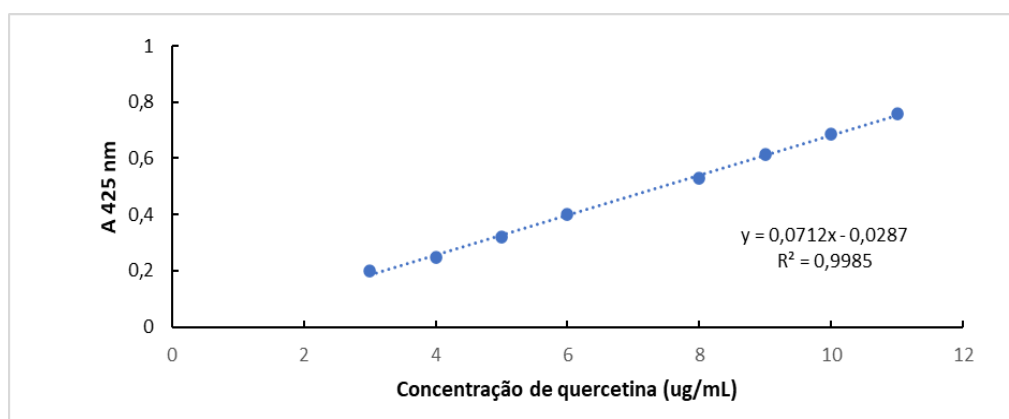
Extrato / parte da planta	Tipo de extração	CE₅₀ (µg/mL)
Canela em pau / casca da árvore	EtOH:H ₂ O (50:50)	9,11 ± 1,17
Romã / sementes	EtOH:H ₂ O (50:50)	27,02 ± 1,08

Legenda: EtOH:H₂O – hidroetanólico; CE₅₀ - concentração que elimina 50% dos radicais livres.
Fonte: Elaborado pelo autor.

5.1.4 Determinação do teor flavonoides totais na amostra

A curva-padrão construída com base em diferentes concentrações de quercetina está demonstrada na figura 11.

Figura 11 – Curva-padrão expressa em quercetina



Fonte: Elaborado pelo autor.

A partir da curva-padrão de quercetina, a quantidade de flavonoides totais dos EHC e EHR foi analisada, os valores estão expressos na tabela 4. Para o EHC, a concentração de flavonoides foi de 0,935 mg/mL (0,094%), e para o EHR obteve-se o valor total de 0.853 mg/mL (0,085%).

Tabela 4 - Teor de flavonoides totais nos EHC e EHR

Extrato / parte da planta	Solvente de extração	FLV (mg/mL)	DP
Canela em pau / casca da árvore	EtOH:H ₂ O (50:50)	0,935	±0,206
Romã / sementes	EtOH:H ₂ O (50:50)	0,853	±0,068

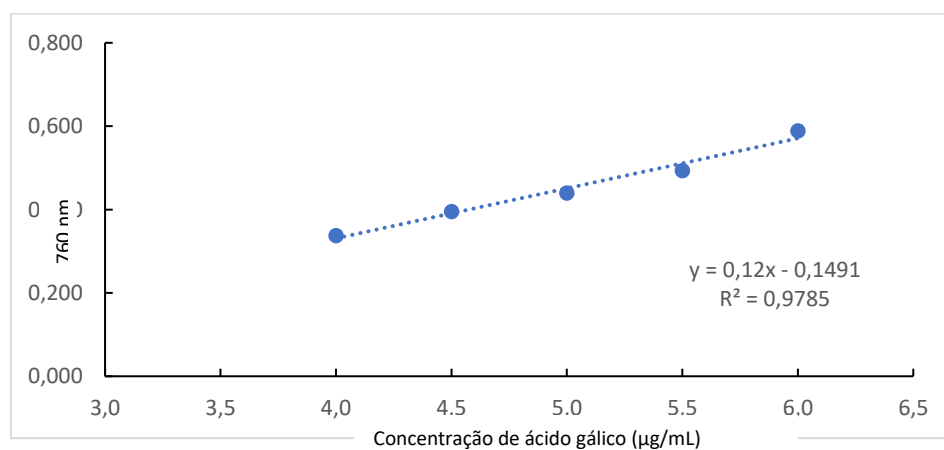
Legenda: EtOH - álcool etílico absoluto; H₂O – água destilada; FLV – flavonoides totais; DP - desvio padrão de três determinações.

Fonte: Elaborado pelo autor.

5.1.5 Determinação do teor fenóis totais na amostra

A curva-padrão construída com base no ácido gálico está demonstrada na figura 12.

Figura 12 - Curva padrão do ácido gálico



Fonte: Elaborado pelo autor.

A partir da construção da curva-padrão do ácido gálico, os EHC e EHR foram analisados e apresentaram o teor de fenóis totais de 2,069 mg/mL (0,207%) e 1,406 mg/mL (0,141%), respectivamente, como demonstrado na tabela 5.

Tabela 5 - Teor de fenóis totais nos EHC e EHR

Extrato / parte da planta	Solvente de extração	Fenóis (mg/mL)	DP
Canela em pau / casca da árvore	EtOH:H ₂ O (50:50)	2,069	±0,174
Romã / sementes	EtOH:H ₂ O (50:50)	1,406	± 0,033

Legenda: EtOH - álcool etílico absoluto); H₂O – água destilada; FLV – flavonoides totais; DP - desvio padrão de três determinações.
Fonte: Elaborado pelo autor.

5.2 Atividade antibacteriana dos extratos em cultura planctônica

5.2.1 Concentração Bactericida Mínima (CBM)

Os EHC e EHR apresentaram atividade bactericida contra todas as cepas avaliadas de *A. baumannii* e *P. aeruginosa*, os valores de CBM estão demonstrados nas tabelas 6 e 7, respectivamente. Não foi possível identificar os valores de Concentração Inibitória Mínima (CIM) devido a turbidez ocasionada pela coloração dos extratos que impossibilitou a leitura visual, portanto, nesse estudo os valores de CBM foram considerados para os próximos ensaios (*checkerboard* e biofilmes).

Para *A. baumannii*, o EHC apresentou CBM de 3,3 mg/mL para todas as cepas, já o EHR demonstrou ação bactericida com os valores variando de 1,5 a 6,1 mg/mL. Para a cepa #Ab 3 e #Ab ATCC, as CBM foram de 3,0 mg/mL e 1,5 mg/mL, respectivamente. Para as demais cepas de *A. baumannii* o valor da CBM de EHR foi de 6,1 mg/mL (Tabela 6). O controle do veículo hidroetanólico (50:50) não apresentou ação antibacteriana sobre todas as cepas de *A. baumannii* e *P. aeruginosa* analisadas.

Tabela 6 - CBM (mg/mL) dos EHC e EHR para cepas ATCC e clínicas de *A. baumannii*

Cepas	EHC	EHR
	CBM	CBM
#Ab 1	3,3	6,1
#Ab 2	3,3	6,1
#Ab 3	3,3	3,0
#Ab 4	3,3	6,1
#Ab ATCC	3,3	1,5

Legenda: EHC- Extrato hidroetanólico de canela; EHR – Extrato hidroetanólico de romã; CBM – Concentração Bactericida Mínima; Ab – *Acinetobacter baumannii*.

Fonte: Elaborado pelo autor.

Em relação a ação antibacteriana dos EHC e EHR frente *P. aeruginosa*, o extrato de canela foi ativo para todas as cepas com o valor de CBM de 6,6 mg/mL. Já o EHR apresentou CBM de 6,1 mg/mL para todas as cepas, exceto #Pa 1 que obteve o valor de 3,0 mg/mL (Tabela 7).

Tabela 7 – CBM (mg/mL) dos EHC e EHR para cepas ATCC e clínicas de *P. aeruginosa*

Cepas	EHC	EHR
	CBM	CBM
#Pa 1	6,6	3,0
#Pa 2	6,6	6,1
#Pa 3	6,6	6,1
#Pa 4	6,6	6,1
#Pa ATCC	6,6	6,1

Legenda: EHC- Extrato hidroetanólico de canela; EHR – Extrato hidroetanólico de romã; CBM – Concentração Bactericida Mínima; Pa – *Pseudomonas aeruginosa*.

Fonte: Elaborado pelo autor.

5.2.2 Efeito sinérgicos dos EHC e EHR associados

Quando os EHC e EHR foram associados e testados frente as cepas bacterianas, obteve-se efeitos sinérgicos para as quatro cepas clínicas de *A. baumannii* (#Ab 1, #Ab 2, #Ab 3 e #Ab 4) com ICBF $\leq 0,50$ (Tabela 8) em culturas planctônicas. Para a cepa #Ab 1 a redução da CBM do EHC foi de até 4x e romã reduziu 1.220x, em relação as cepas #Ab 2, # Ab 3 e #Ab 4, o EHC teve sua CBM reduzida em até 2x e EHR em até 1.220x. Para as demais cepas (Ab ATCC e *P. aeruginosa*) não houve inibição do crescimento bacteriano (Tabela 8)

Tabela 8 - Valores da concentração bactericida mínima (CBM) dos EHC e EHR isolados e associados, e do efeito sinérgico da combinação sobre cepas clínicas de *A. baumannii*

CEPAS	CBM Isolado		CBM Comb.		ICBF	Redução da CBM isolada		Efeito
	EHC	EHR	EHC	EHR		EHC	EHR	
#Ab 1	3,3	6,1	0,82	1,52	0,49	4x	4x	Sinérgico
#Ab 1	3,3	6,1	1,6	0,09	0,49	2x	67x	Sinérgico
#Ab 1	3,3	6,1	1,6	0,04	0,49	2x	152x	Sinérgico
#Ab 1	3,3	6,1	3,3	0,02	0,48	1x	305x	Sinérgico
#Ab 1	3,3	6,1	1,6	0,01	0,48	2x	610x	Sinérgico
#Ab 1	3,3	6,1	1,6	0,005	0,48	2x	1.220x	Sinérgico
#Ab 2	3,3	6,1	1,6	0,04	0,49	2x	1220x	Sinérgico
#Ab 2	3,3	6,1	1,6	0,02	0,48	2x	305x	Sinérgico
#Ab 3	3,3	3,0	1,6	0,04	0,49	2x	75x	Sinérgico
#Ab 3	3,3	3,0	1,6	0,02	0,49	2x	150x	Sinérgico
#Ab 3	3,3	3,0	1,6	0,01	0,48	2x	300x	Sinérgico
#Ab 4	3,3	6,1	0,82	1,52	0,49	4x	4x	Sinérgico

Legenda: EHC- Extrato hidroetanólico de canela; EHR – Extrato hidroetanólico de romã; CBM – Concentração Bactericida Mínima; EHC– extrato hidroetanólico de canela; EHR – extrato hidroetanólico de romã; Comb. – combinação; ICBF: índice de concentração bactericida fracionada. Os valores estão expressos em mg/mL.

Fonte: Elaborado pelo autor.

5.3 Atividade antibiofilme dos EHC e EHR isolados e associados frente *A. baumannii* e *P. aeruginosa*

5.3.1 Inibição da formação de biofilme (prevenção) dos extratos isolados

Quando os EHC e EHR foram testados separadamente para avaliar a ação inibitória de formação de biofilme, observou-se inibições significativas para todas as cepas.

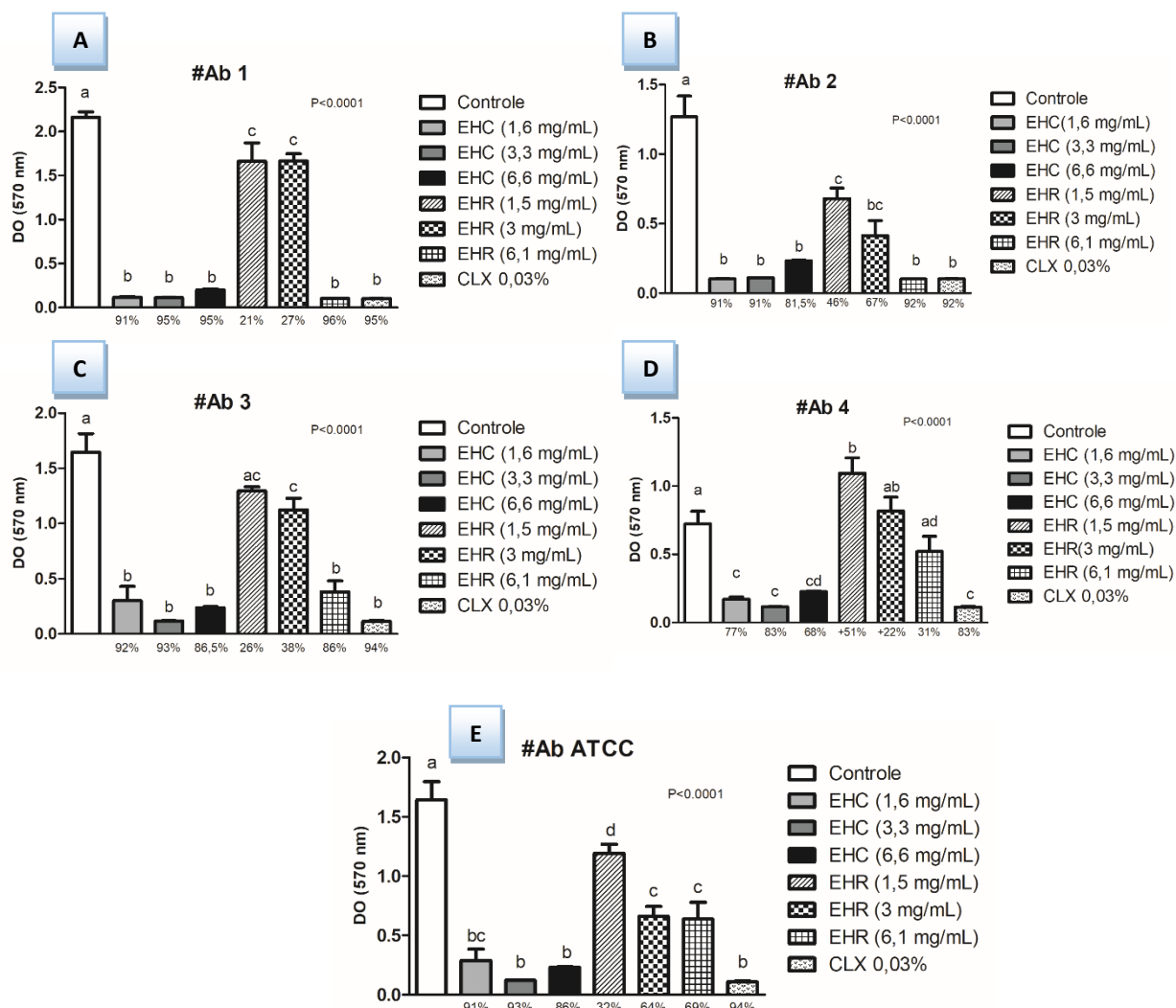
Para a cepa #Ab 1, o EHC na concentração de 1,6 mg/mL inibiu a formação de biofilme em 91%, já as concentrações de 3,3 mg/mL e 6,6 mg/mL promoveram inibição significativa de 95% quando comparado ao controle negativo (caldo BHI) e todos os grupos tiveram ação semelhante à clorexidina 0,03% ($p < 0.0001$). Já o EHR, quando testado na concentração de 6,1 mg/mL inibiu a formação em 96%, enquanto as concentrações de 1,5 e 3,0 mg/mL apresentaram inibição significativa de 21% e 27% ($p < 0.0001$), respectivamente (Figura 13A).

Em relação a cepa #Ab 2, EHC apresentou inibições significativas de 91% quando testada nas concentrações de 1,6 mg/mL e 3,3 mg/mL, e inibição de 81,5% quando aplicada a concentração de 6,6 mg/mL ($p < 0.0001$). O EHR na concentração de 1,5 mg/mL inibiu significativamente 46% a formação de biofilme, e nas concentrações de 3,0 e 6,1 mg/mL as inibições foram de 67% e 92% ($p < 0.0001$), respectivamente, e apresentaram semelhança estatística com o grupo tratado com clorexidina 0,3% ($p < 0.0001$) (Figura 13B).

O EHC inibiu estatisticamente a formação de biofilme da cepa #Ab 3, nas concentrações de 1,6 mg/mL, 3,3 mg/mL e 6,6 mg/mL. As inibições foram de 92%, 93% e 86,5% quando comparado ao grupo controle e apresentaram semelhança estatística com clorexidina 0,03% ($p < 0.0001$). Para essa mesma cepa, o EHR reduziu significativamente a formação de biofilme em 38% e 86% quando utilizado nas concentrações de 3 e 6,1 mg/mL, respectivamente. Já a concentração de 1,5 mg/mL não apresentou diferença estatística em relação ao controle ($p < 0.0001$) (Figura 13C).

A inibição do biofilme da cepa #Ab 4 foi significativa quando o mesmo ficou em contato com as três concentrações (1,6 mg/mL, 3,3 mg/mL e 6,6 mg/mL) do EHC, promovendo inibição de 77%, 83% e 68%, nessa ordem. Já o EHR não apresentou inibição significativa da formação de biofilme em relação ao controle ($p < 0.0001$) (Figura 13D).

Para a cepa padrão Ab ATCC 19606 (Figura 13E), o EHC inibiu a formação de biofilme em 91%, 93% e 86% quando em contato com as concentrações de 1,6 mg/mL, 3,3 mg/mL e 6,6 mg/mL, respectivamente ($p < 0.0001$). Para o EHR, as inibições também foram significativas, com 32%, 64% e 69% quando em contato com as concentrações de 1,5 mg/L, 3 mg/mL e 6,1 mg/mL, nessa ordem ($p < 0.0001$).

Figura 13 - Inibição da formação de biofilme de *A. baumannii* dos extratos isolados

Legenda: DO – Densidade óptica; EHC – extrato hidroetanólico de canela; EHR – extrato hidroetanólico de romã; CLX – clorexidina 0,03%. As letras “a”, “b”, “c” e “d” demonstram a semelhança ou diferença estatisticamente significativa entre os grupos ($p < 0.0001$). Os dados obtiveram distribuição normal e foram analisados método ANOVA complementado pelo Teste de Tukey.

Fonte: Elaborado pelo autor.

Para cepa clínica #Pa 1 de *P. aeruginosa* (Figura 14A), o EHC inibiu em 91,5% e 85%, quando utilizados nas concentrações de 3,3 mg/mL e 6,6 mg/mL ($p < 0.0001$), respectivamente. Em relação ao EHR não houve inibição significativa da formação de biofilme em nenhuma das concentrações testadas.

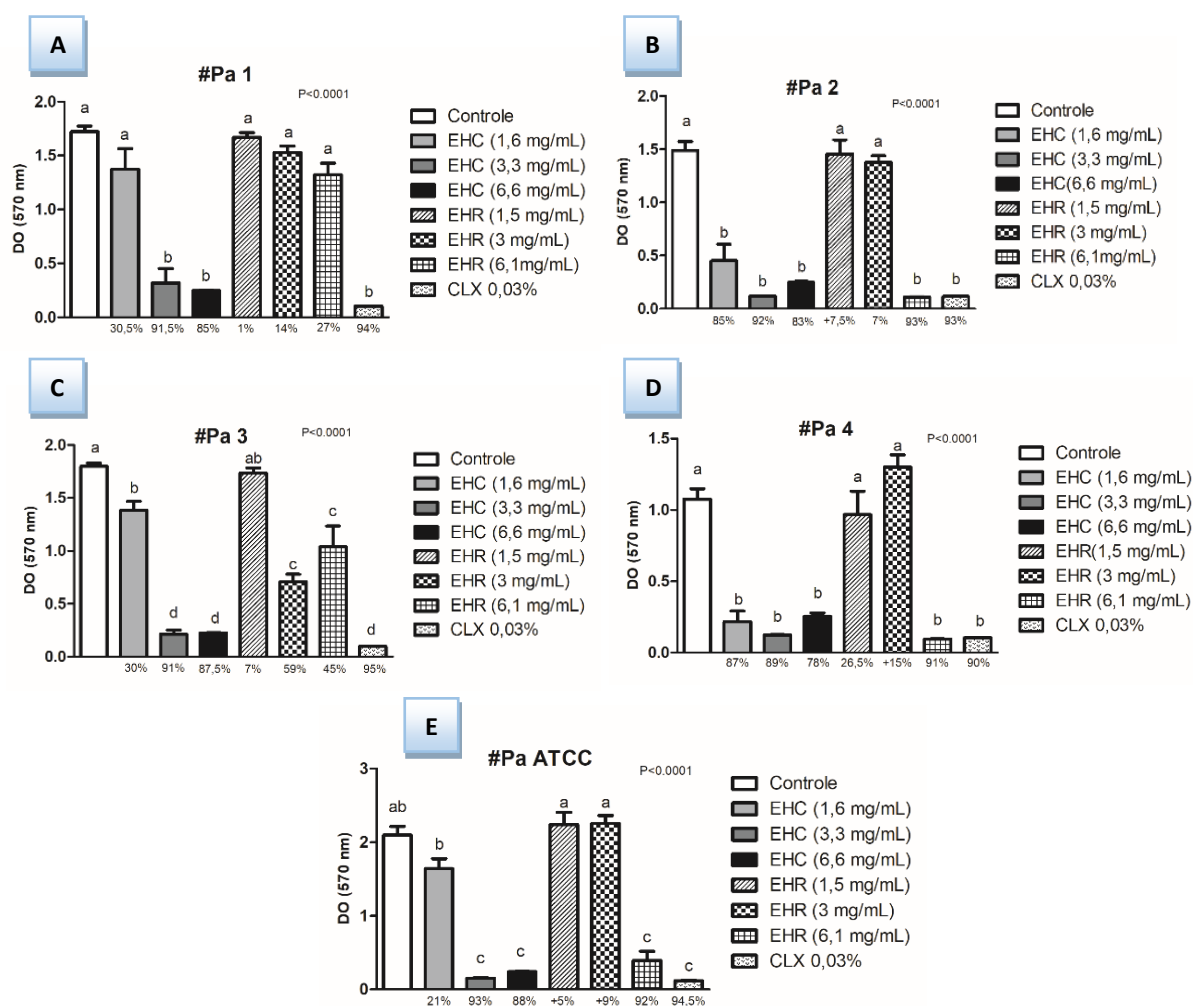
O EHC inibiu a formação de biofilme da cepa clínica #Pa 2 (Figura 14B) quando utilizado nas três concentrações (1,6 mg/mL, 3,3 mg/mL e 6,6 mg/mL), com 85%, 92% e 83% de inibição ($p < 0.0001$), respectivamente. Já o EHR, quando

testado na concentração de 6,1 mg/mL apresentou inibição de 93% da formação de biofilme ($p<0.0001$).

Em relação a cepa #Pa 3, o EHC na concentração de 1,6 mg/mL apresentou inibição significativa de 30%, e para as demais concentrações (3,3 e 6,6 mg/mL), as inibições foram de 91% e 87%, estatisticamente semelhante à clorexidina 0,3% ($p<0.0001$). Para o EHR, as concentrações efetivas foram 3 e 6,1 mg/mL, com inibições de 59% e 45% da formação de biofilme (Figura 14C).

A cepa clínica #Pa 4 teve inibições da formação de biofilme em 87%, 89% e 78% quando em contato com as concentrações de 1,6 mg/mL, 3,3 mg/mL e 6,6 mg/mL do EHC ($p<0.0001$), respectivamente. Em relação ao EHR, apenas a concentração maior (6,1 mg/mL) apresentou potencial inibitório de 91% ($p<0.0001$) da formação de biofilme, como demonstrado na figura 14D.

Para a cepa padrão de Pa ATCC 15442, o EHC apresentou potencial inibitório do biofilme nas concentrações de 3,3 e 6,6 mg/mL, com 93% e 86% de inibição ($p<0.0001$), nessa ordem. Já o EHR inibiu a formação de biofilme na concentração de 6,1 mg/mL em 92% ($p<0.0001$) (Figura 14E).

Figura 14 - Inibição da formação de biofilme de *P. aeruginosa* dos extratos isolados

Legenda: DO – Densidade óptica; EHC – extrato hidroetanólico de canela; EHR– extrato hidroetanólico de romã; CLX – clorexidina 0,03%. As letras “a”, “b”, “c” e “d” demonstram a semelhança ou diferença estatisticamente significativa entre os grupos ($p < 0.0001$). Os dados obtiveram distribuição normal e foram analisados método ANOVA complementado pelo Teste de Tukey.

Fonte: Elaborado pelo autor.

5.3.2 Inibição da formação de biofilme (prevenção) dos extratos associados

Para avaliar a inibição da formação de biofilme com os EHC e EHR associados, foram eleitas três combinações sinérgicas: EHC 0,82 + EHR 1,52; EHC 1,6 + EHR 0,04 e EHC 1,6 + EHR 0,02.

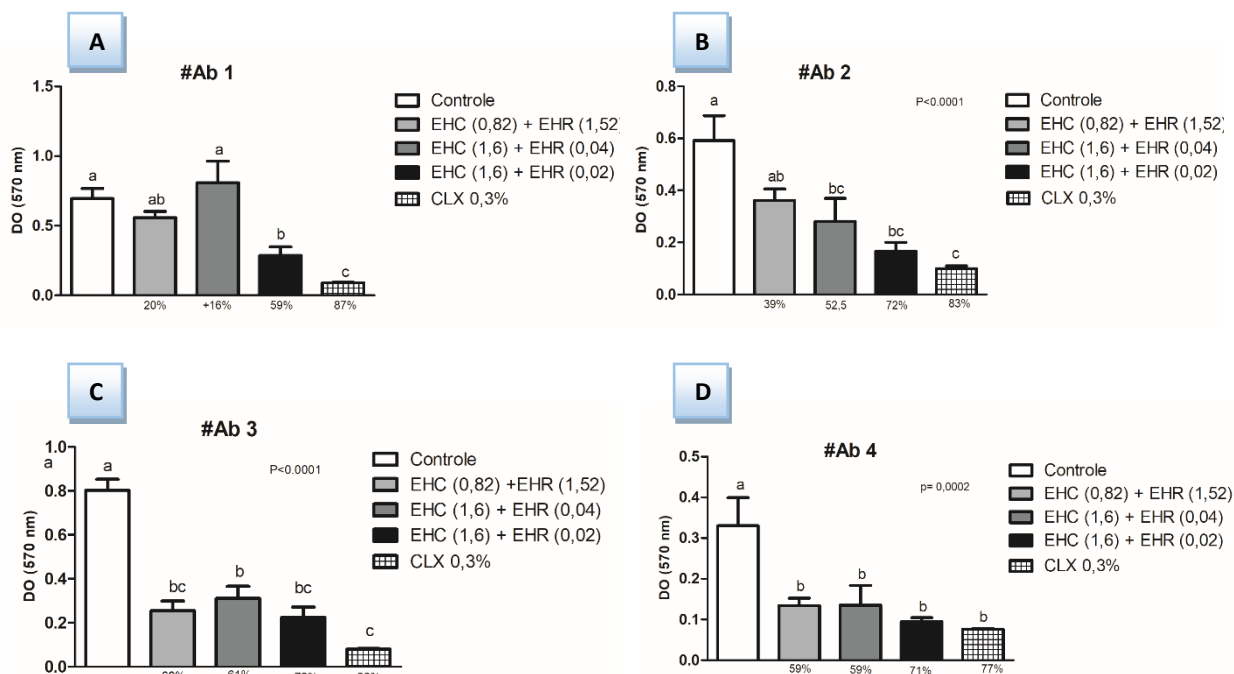
Quando associados, os extratos (EHC 1,6 + EHR 0,02) apresentaram potencial inibitório de 59% ($p < 0.0001$) da formação de biofilme da cepa clínica #Ab 1, estatisticamente semelhante aos valores de CBM isolados dos dois extratos e ao grupo tratado com clorexidina 0,3%, como demonstrado na figura 15A.

Em relação a cepa #Ab 2 (figura 15B), as combinações de EHC 1,6 com 0,04 e 0,02 mg/mL de EHR inibiram significativamente a formação de biofilme em 52,5 e 72%, sendo semelhantes estatisticamente com os grupos tratados com CBM isolados e com a clorexidina ($p < 0.0001$).

Todas as combinações selecionadas de EHC e EHR foram efetivas na inibição da formação de biofilme da cepa #Ab 3, com valores inibitórios de 68%, 61% e 72% ($p < 0.0001$). Esses valores foram semelhantes estatisticamente com os grupos tratados com CBM isoladas dos extratos (Figura 15C).

Para a cepa #Ab 4 (figura 15D), todas as combinações foram capazes de inibir a formação de biofilme. Quando em contato com as concentrações de EHC 0,82 + EHR 1,52 e EHC 1,6 + EHR 0,04, a inibição foi de 59% ($p < 0.0001$) para ambas combinações. Para a associação de EHC 1,6 + EHR 0,02 a inibição foi de 71% ($p < 0.0001$).

Figura 15 - Inibição da formação de biofilme de *A. baumannii* dos extratos associados



Legenda: DO – Densidade óptica; EHC – extrato hidroetanólico de canela; EHR– extrato hidroetanólico de romã; CLX – clorexidina 0,03%. As letras “a”, “b”, “c” e “d” demonstram a semelhança ou diferença estatisticamente significativa entre os grupos ($p < 0.0001$). Os dados obtiveram distribuição normal e foram analisados método ANOVA complementado pelo Teste de Tukey.

Fonte: Elaborado pelo autor.

5.3.3 Tratamento (24 h) de biofilmes formados com os extratos isolados

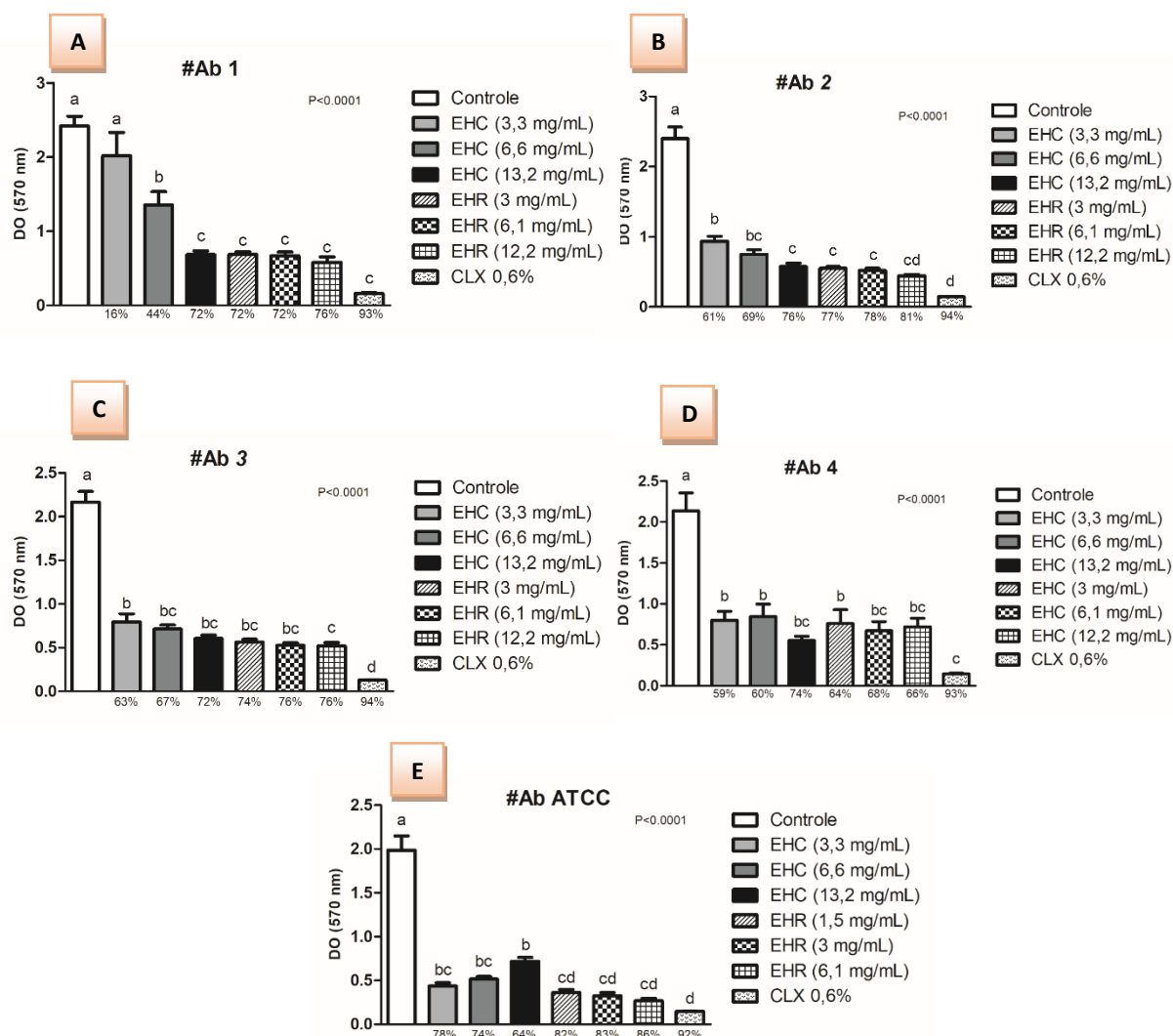
Após 24 h de tratamento com EHC e EHR, houve reduções significativas da viabilidade do biofilme em todas as cepas de *A. baumannii*. Para a cepa #Ab 1, houve reduções de 44% e 72% ($p < 0.0001$) do biofilme quando tratado com o EHC nas concentrações de 6,6 mg/mL e 13,2 mg/mL, respectivamente. Já utilizando as concentrações de 3 e 6,1 mg/mL do EHR, as reduções foram de 72% para ambos os grupos, e quando testado a concentração de 12,2 mg/mL, a redução do biofilme foi de 76% ($p < 0.0001$), apresentando semelhança ao grupo tratado com clorexidina 0,6% (Figura 16A).

Para a cepa clínica #Ab 2 (Figura 16B), o EHC reduziu em 61%, 69% e 76% ($p<0.0001$) a viabilidade do biofilme quando tratado com as concentrações de 3,3 mg/mL, 6,6 mg/mL e 13,2 mg/mL, respectivamente. O EHR, na concentração de 3 mg/mL, reduziu a viabilidade do biofilme em 77% ($p<0.0001$), enquanto que as concentrações de 6,1 e 12,2 mg/mL, promoveram reduções de 78% e 81% ($p<0.0001$), respectivamente.

O EHC, quando utilizado nas três concentrações (3,3 mg/mL, 6,6 mg/mL e 13,2 mg/mL) reduziu a viabilidade do biofilme da cepa clínica #Ab 3 em 63%, 67% e 72% ($p<0.0001$), respectivamente. Em relação ao EHR, a concentração de 3 mg/mL reduziu em 74% ($p<0.0001$) a viabilidade do biofilme, já as concentrações de 6,1 e 12,2 mg/mL reduziram 76% ($p<0.0001$), como demonstrado na figura 16C.

Quando o EHC foi testado sobre biofilme da cepa #Ab 4, houveram reduções significativa de 59%, 60% e 74% ($p<0.0001$), quando testado nas concentrações de 3,3 mg/mL, 6,6 mg/mL e 13,2 mg/mL, sendo a redução promovida pela concentração maior do extrato semelhante com o grupo tratado com clorexidina 0,6%. Em relação a ação antibiofilme do EHR, o mesmo promoveu reduções significativas de 64%, 68% e 66% ($p<0.0001$) quando tratados com as concentrações de 3 mg/mL, 6,1 mg/mL e 12,2 mg/mL, respectivamente. Os grupos tratados com o EHR a 6,1 e 12,2 mg/mL apresentaram reduções significativas semelhantes à clorexidina 0,6% (Figura 16D).

Para a cepa padrão de Ab ATCC, o EHC promoveu reduções significativas de 78%, 74% e 64% ($p<0.0001$) do biofilme, quando mesmo foi tratado com as concentrações de 3,3 mg/mL, 6,6 mg/mL e 13,2 mg/mL. Já após 24 h de contato com o EHR, as reduções foram de 82%, 83% e 86% ($p<0.0001$), quando aplicados os tratamentos de 1,5 mg/mL, 3 mg/mL e 6,1 mg/mL, respectivamente (Figura 16E).

Figura 16 - Tratamento de biofilmes formados de *A. baumannii* com extratos isolados

Legenda: DO – Densidade óptica; EHC – extrato hidroetanólico de canela; EHR – extrato hidroetanólico de romã; CLX – clorexidina 0,03%. As letras “a”, “b”, “c” e “d” demonstram a semelhança ou diferença estatisticamente significativa entre os grupos ($p < 0.0001$). Os dados obtiveram distribuição normal e foram analisados método ANOVA complementado pelo Teste de Tukey.

Fonte: Elaborado pelo autor.

Em relação a ação antibiofilme dos extratos frente *P. aeruginosa*, após 24 h de tratamento, o EHC promoveu redução significativa de 46%, 73% e 80% ($p < 0.0001$) quando utilizado nas concentrações de 3,3 mg/mL, 6,6 mg/mL e 13,2 mg/mL, respectivamente, sendo a concentração maior do extrato semelhante estatisticamente com clorexidina 0,6%. Quando os biofilmes foram tratados com as

concentrações de 3 mg/mL, 6,1 mg/mL e 12,2 mg/mL do EHR, as reduções da viabilidade foram de 73%, 76% e 71%, nessa ordem (Figura 17A).

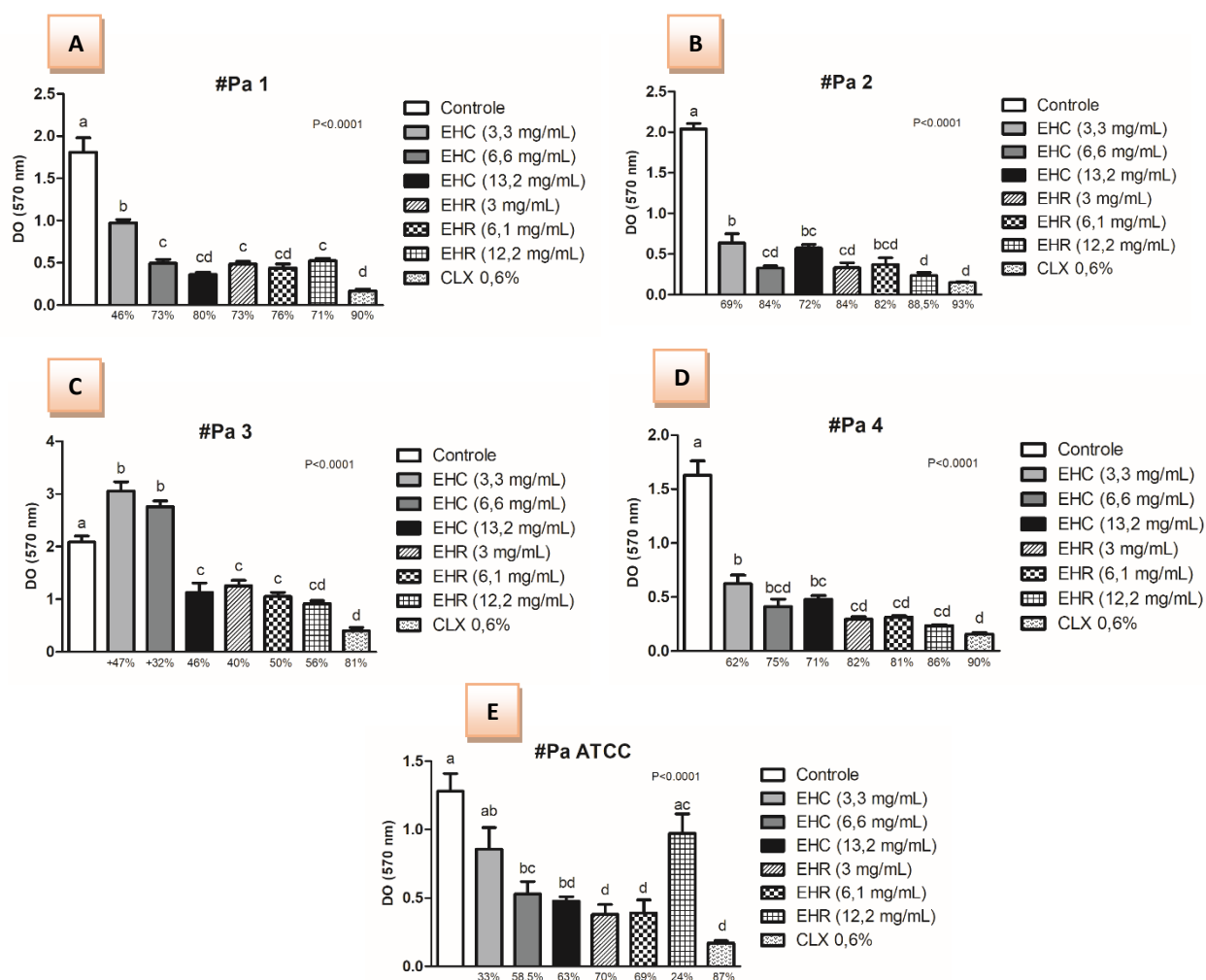
Para a cepa #Pa 2, o EHC na concentração de 3,3 mg/mL reduziu em 69% ($p<0.0001$) a viabilidade do biofilme, já as concentrações de 6,6 e 13,2 mg/mL promoveram reduções significativas de 84% e 72% ($p<0.0001$), respectivamente. O EHR também apresentou ação antibiofilme, reduzindo a viabilidade do mesmo em 84%, 82% e 88,5%, quando tratados com 3 mg/mL, 6,1 mg/mL e 12,2 mg/mL do extrato hidroetanólico, respectivamente, como demonstrado na figura 17B.

Em relação a cepa clínica #Pa 3 (Figura 17C), somente a concentração de 13,2 mg/mL do EHC promoveu redução significativa do biofilme (46%). Já o EHR reduziu estatisticamente ($p<0.0001$) a viabilidade do mesmo (40%, 50% e 56%) quando testado nas três concentrações (3 mg/mL, 6,1 mg/mL e 12,2 mg/mL), nessa ordem. A concentração de 12,2 mg/mL do EHR promoveu redução semelhante à clorexidina 0,6%.

Quando o biofilme da cepa #Pa 4 foi tratado por 24 h com as concentrações de 3,3 mg/mL, 6,6 mg/mL e 13,2 mg/mL do EHC, as reduções da viabilidade do biofilme foram 62%, 75% e 71% ($p<0.0001$), respectivamente. Quando tratado com o EHR, nas concentrações de 3 mg/mL, 6,1 mg/mL e 12,2 mg/mL, as reduções foram de 82%, 81% e 86%, respectivamente (Figura 17D).

Para a cepa padrão de Pa ATCC, o EHC apresentou redução significativa quando testado nas concentrações de 6,6 e 13,2 mg/mL, com reduções de 58,5% e 63% ($p<0.0001$), respectivamente. O EHR teve ação antibiofilme quando testado nas concentrações de 3 e 6,1 mg/mL, reduziu significativamente a viabilidade do biofilme em 70% e 69% ($p<0.0001$), respectivamente, semelhante ao grupo tratado com clorexidina 0,6% (Figura 17E).

Figura 17 - Tratamento de biofilmes formados de *P. aeruginosa* com extratos isolados



Legenda: DO – Densidade óptica; EHC – extrato hidroetanólico de canela; EHR – extrato hidroetanólico de romã; CLX – clorexidina 0,03%. As letras “a”, “b”, “c” e “d” demonstram a semelhança ou diferença estatisticamente significativa entre os grupos ($p < 0.0001$). Os dados obtiveram distribuição normal e foram analisados método ANOVA complementado pelo Teste de Tukey.

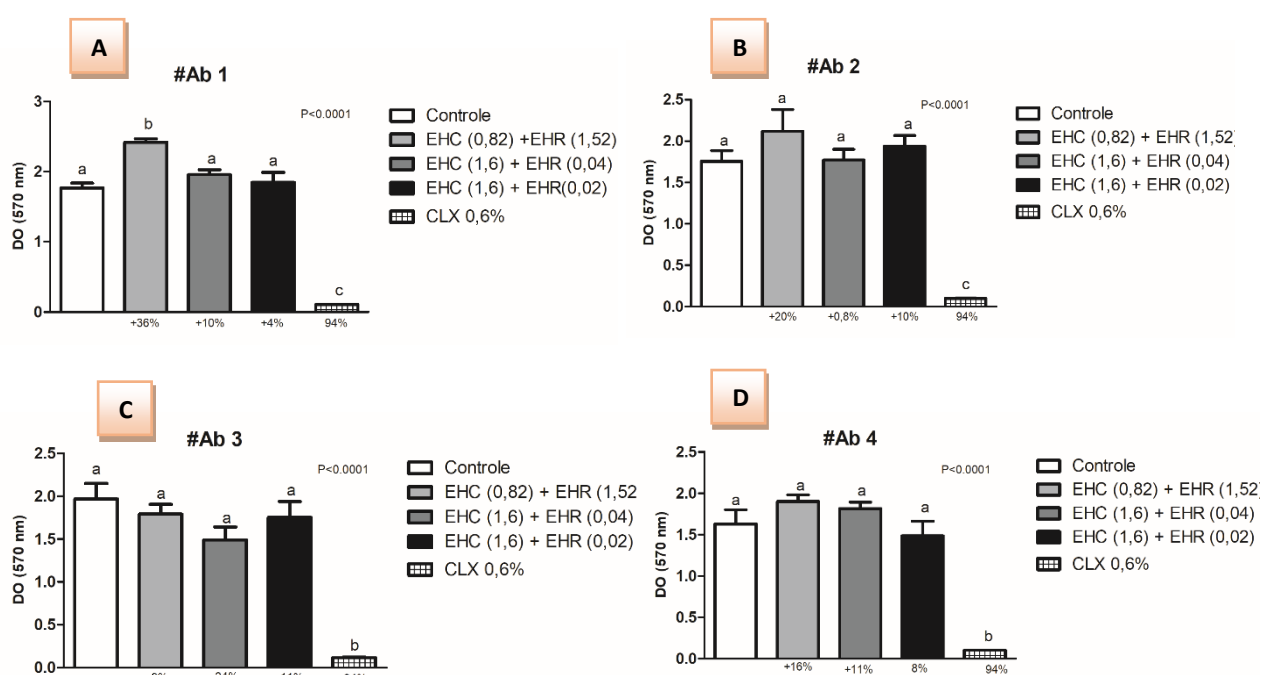
Fonte: Elaborado pelo autor.

5.3.4 Tratamento (24 h) de biofilmes formados com os extratos associados

Para avaliar a ação antibiofilme após tratamento de 24 h com os extratos de canela e romã associados, foram eleitas três combinações sinérgicas (EHC 0,82 + EHR 1,52; EHC 1,6 + EHR 0,04 e EHC 1,6 + EHR 0,02). As associações sinérgicas

dos extratos EHC e EHR não apresentaram reduções significativas do biofilme para nenhuma cepa de *A. baumannii* analisada. Apenas as concentrações de CBM isoladas dos extratos apresentaram reduções significativas (Figura 18).

Figura 18 - Tratamento de biofilmes formados de *A. baumannii* com extratos associados



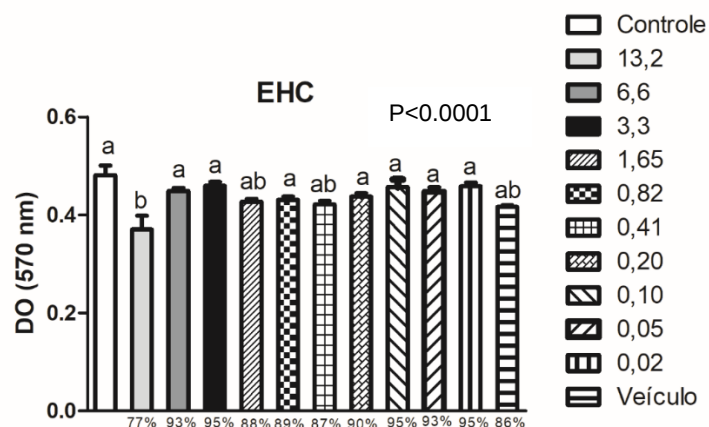
Legenda: DO – Densidade óptica; EHC – extrato hidroetanólico de canela; EHR – extrato hidroetanólico de romã; CLX – clorexidina 0,03%. As letras “a”, “b”, “c” e “d” demonstram a semelhança ou diferença estatisticamente significativa entre os grupos ($p < 0.0001$). Os dados obtiveram distribuição normal e foram analisados método ANOVA complementado pelo Teste de Tukey.

Fonte: Elaborado pelo autor.

5.4 Citotoxicidade

Após tratamento com o EHC, a viabilidade das células HaCat foi acima de 70% em todos os grupos tratados (13,2-0,02 mg/mL), indicando baixa toxicidade ($P < 0.0001$) (Figura 19). A baixa toxicidade também foi observada no grupo tratado com o veículo EtOH:H₂O (50:50) onde a viabilidade foi de 86%.

Figura 19 – Citotoxicidade do EHC (mg/mL)

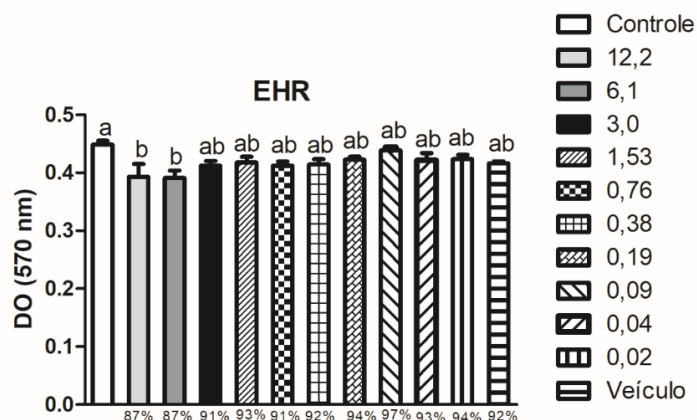


Legenda: DO – Densidade óptica; EHC – Extrato hidroetanólico de canela; CLX – clorexidina 0,6%; Veículo – EtOH:H₂O (50:50); Controle – Meio DMEM; As letras “a”, “b”, “c” e “d” demonstram a semelhança ou diferença estatisticamente significativa entre os grupos ($p < 0.0001$). Os dados obtiveram distribuição normal e foram analisados método ANOVA complementado pelo Teste de Tukey.

Fonte: Elaborado pelo autor.

Quando tratados com diferentes concentrações de EHR (12,2-0,02 mg/mL) a viabilidade também foi maior de 70% em todos os grupos tratados, inclusive o controle utilizando o veículo (EtOH:H₂O).

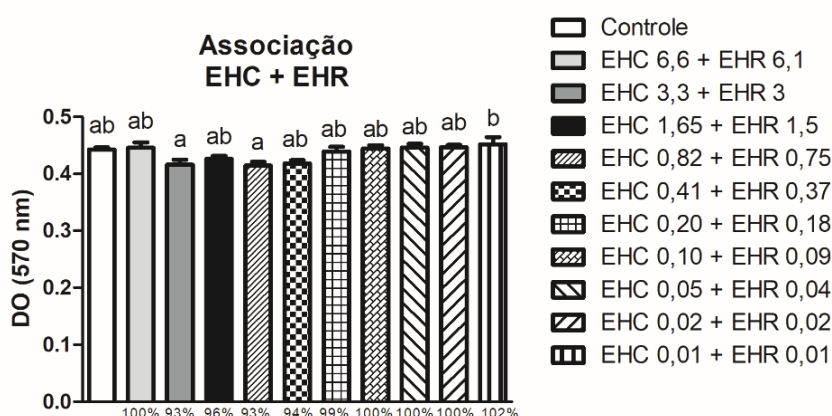
Figura 20 – Citotoxicidade do EHR (mg/mL)



Legenda: DO – Densidade óptica; CA – Canela; RO – Romã; CLX – clorexidina 0,6%; Veículo – EtOH:H₂O (50:50); Controle – Meio DMEM. As letras “a”, “b”, “c” e “d” demonstram a semelhança ou diferença estatisticamente significativa entre os grupos ($p < 0.0001$). Os dados obtiveram distribuição normal e foram analisados método ANOVA complementado pelo Teste de *Tukey*.
Fonte: Elaborado pelo autor.

Os extratos associados mantiveram a viabilidade acima de 93% em todos os grupos e nenhum grupo apresentou diferença estatística com o controle contendo meio DMEM.

Figura 21 – Citotoxicidade dos EHC e EHR associados (mg/mL)



Legenda: DO – Densidade óptica; CA – Canela; RO – Romã; CLX – clorexidina 0,6%; Veículo – EtOH:H₂O (50:50); Controle – Meio DMEM. As letras “a”, “b”, “c” e “d” demonstram a semelhança ou diferença estatisticamente significativa entre os grupos ($p < 0.0001$). Os dados obtiveram distribuição normal e foram analisados método ANOVA complementado pelo Teste de *Tukey*.
Fonte: Elaborado pelo autor.

6 DISCUSSÃO

Devido à necessidade de pesquisar novas alternativas de tratamentos para bactérias resistentes a antibióticos, nosso estudo focou em analisar os efeitos terapêuticos dos EHC e EHR tanto em cultura planctônica quanto em biofilmes, bem como sua ação antioxidante e citotoxicidade para que futuramente esses extratos possam fazer parte de tratamentos integrativos contra infecções causadas por esses patógenos resistentes.

A presença de constituintes fitoquímicos em extratos de plantas determina as diferentes ações terapêuticas, nesse estudo foram encontrados efeitos antibacterianos, antibiofilmes, antioxidantes nos EHC e EHR. Esses efeitos, segundo a literatura, são provenientes da presença de flavonoides, fenóis, alcaloides, taninos, glicosídeos, saponinas e terpenóides (Amsterdam et al., 2009; Dubale et al., 2023; Talib, Mahasneh, 2010). Esse estudo identificou a presença de flavonoides e fenóis totais tanto no EHC quanto no EHR, sendo os valores de flavonoides de 0,935 e 0,853 mg/mL, respectivamente, e os valores de fenóis de 2,069 mg/mL para o EHC e 1,406 mg/mL para EHR. A quantidade de fenóis totais foi quantificada em um outro estudo utilizando a canela, onde o extrato aquoso apresentou 0,380 mg/mL (Singh et al., 2008), a diferença dos valores encontrados em nosso estudo e o de Singh et al. (2008) pode ser atribuída pelos diferentes métodos de extração (solvente, método de destilação, prensagem e sublimação) e o solvente utilizado (etanol, água, metanol, entre outros), assim pode-se extrair diferentes compostos (Joshi et al., 2019), no caso deste estudo o solvente utilizado foi hidroetanólico, já o utilizado por Singh et al. (2008) foi aquoso. A seleção do solvente é primordial para a extração de compostos, quando os solventes e solutos são similares no quesito polaridade, a eficácia de extração melhora, além disso, o tamanho da partícula também interfere no resultado final da extração, quanto mais fina melhor a eficácia (Zhang et al., 2018). O que diferencia também os resultados quando se utilizam solventes diferentes é o tempo de duração da extração em uma determinada faixa de tempo, quanto maior a relação de solvente e soluto maior o rendimento de extração (Zhang et al., 2018). Isso pode ser observado quando se compara a presença de fitoquímicos em óleos e extratos hidroetanólicos. Após a análise por

HPLC, detectou-se a presença de cerca de 65 a 80% (650 a 800 mg/mL) de cinamaldeído (ácido cinâmico) e de até 10% (100 mg/mL) de eugenol no óleo volátil hidrodestilado extraído da casca de canela (Jayaprakasha et al., 2002; Vangalapati et al., 2012). Em nossas análises, o EHC teve o valor encontrado de aldeído cinâmico foi de 0,771 mg/mL, a quantidade inferior foi devida as diferentes polaridades dos solventes.

Já para a romã, os extratos obtidos da casca e flores extraídos com uma mistura de água e etanol 70:30 (V/V) demonstraram ter o teor de fenóis totais de 12,34 $\mu\text{mol GAE/g}$ (2,1 mg/mL) (Gigliobianco et al., 2022). Outro estudo demonstrou compostos fenólicos variando de 1,29 a 2,17 mg GAE/g (1,29 a 2,17 mg/mL) de extratos metanólicos de sementes de romã chinesa (Jing et al., 2012). O teor de fenóis totais encontrado em nosso estudo foi de 1,40 mg/mL para o extrato hidroetanólico obtido das sementes de romã. Em todos os estudos mencionados, o método de Folin-Ciocalteu foi utilizado. Os flavonoides totais variaram de 1,76 a 2,11 mg/mL e 5,92 a 16,92 mg/mL no extrato metanólico da semente de romã (Orak et al., 2012; Sabraoui et al., 2020), em nosso estudo o valor encontrado foi de 0,853 mg/mL no extrato hidroetanólico.

Em relação a ação antioxidante de canela e romã, utilizando o método do radical de eliminação DDPH, que é um dos mais utilizados para determinar a capacidade antioxidante de diferentes compostos, o óleo de canela apresentou forte capacidade de sequestro de radicais livres com CE_{50} de 4,78 $\mu\text{g/mL}$ (Mutlu et al., 2023). Os valores de CE_{50} do extrato etanólico e aquoso de canela indicaram potente ação antioxidante (21,25 e 15,71 $\mu\text{g/mL}$, respectivamente). Em outro estudo, a concentração de atividade antioxidante (CE_{50}) foi de 29,01 $\mu\text{g/mL}$ para o extrato aquoso de canela (Lima et al., 2022). Já em nosso estudo, o valor de CE_{50} encontrado para o EHC foi de 9,11 $\mu\text{g/mL}$, indicando potente ação antioxidante. Em relação ao extrato de romã, os valores obtidos de CE_{50} foi de 42 e 65 $\mu\text{g/mL}$ (casca) e de 888 e 1.945 $\mu\text{g/mL}$ (sementes) para os extratos metanólicos extraídos de romãs cultivadas no Marrocos (Sabraoui et al., 2020). Em um outro estudo, o extrato metanólico extraído da casca da romã apresentou 81% de atividade antioxidante e 23,2% quando extraído das sementes desse fruto (Singh et al., 2002). Na literatura há mais estudos envolvendo a ação antioxidante de extratos obtidos da casca de romã, porém os extratos obtidos das sementes também possuem ação terapêutica

promissora (Singh et al., 2002). Esse estudo corrobora com os mencionados anteriores em relação a capacidade antioxidante das sementes da romã. O EHR obtido das sementes apresenta o valor de CE_{50} de 27,02 $\mu\text{g/mL}$, demonstrando importante ação antioxidante.

Diante da presença de fitocompostos que possuem diferentes efeitos terapêuticos, é de suma importância investigar cada vez mais essas ações. Assim, a composição química, o potencial antioxidante e antimicrobiano do extrato bruto das folhas de canela e suas frações enriquecidas foram investigadas e avaliadas contra vinte e duas bactérias, sendo que para Gram-negativas, tais como *K. pneumoniae* e *P. aeruginosa* multirresistente, o extrato demonstrou baixa atividade com valor de CIM de 1000 mg/mL (de Lima et al., 2022). Porém em nosso estudo, para as cepas clínicas multirresistentes de *A. baumannii* e *P. aeruginosa*, o EHC apresentou um valor mais baixo de CBM, de 3,3 mg/mL e 6,6 mg/mL, respectivamente, para todas as cepas avaliadas. Valores de CIM variando de 0,25-0,5 mg/mL de óleo essencial de canela contra cepas de *A. baumannii* multirresistentes foram encontrados por Ganic et al. (2022), além disso, a emulsão de canela foi ativa com valores de 0,125-0,25 mg/mL contra essas mesmas cepas. Apesar de existirem na literatura estudos demonstrando diferentes propriedades terapêuticas da canela, quando se trata de extratos hidroetanólicos extraídos das sementes, as publicações científicas ainda são escassas.

A ação antimicrobiana da romã tem sido reportada na literatura (Dey et al., 2015; Trabelsi et al., 2020). O extrato metanol/água da casca de romã e seus constituintes isolados foram ativos contra *Mycobacterium tuberculosis* e *Klebsiella pneumoniae* produtoras de β -lactamases. Para patógenos multirresistentes, frações totais de HPLC de *P. granatum* mostraram atividade antimicrobiana potente quando analisadas as zonas inibitórias pelo método de disco de difusão (Dey et al., 2015). Extratos aquosos apresentaram atividade contra *P. aeruginosa*, *E. coli* e *A. baumannii*, e o etanólico se destacou na ação contra *A. baumannii* (Khan et al., 2017). O extrato etanólico de *P. granatum* foi testado contra *S. aureus*, *Enterobacter aerogenes* e *E. coli* em um outro estudo e os valores de CBM foram de $25 \pm 0,65$, $50 \pm 0,54$ e $50 \pm 0,75$ mg/mL e os resultados de CIM obtidos após testar o extrato metanólico foi de $50 \pm 1,11$, $25 \pm 1,01$ e $25 \pm 1,21$ mg/mL, para *S. aureus*, *E. aerogenes* e *E. coli* foram de $50 \pm 1,11$, $25 \pm 1,01$ e $25 \pm 1,21$ mg/mL,

respectivamente (Jam et al., 2022). Extrato hidroetanólico da casca de *P. granatum* foi investigado também contra *P. aeruginosa*, a faixa de concentração testada foi de 0,5–500 µg/mL, onde o crescimento desta bactéria foi notavelmente inibido a partir de 50 µg/mL (Joshi et al., 2019). A ação antibacteriana da romã também foi identificada em nosso estudo, porém analisando o extrato hidroetanólico obtido das sementes, no qual os estudos são escassos. O EHR teve valor de CBM variando de 1,5-6,1 mg/mL para cepas clínicas de *A. baumannii*, e de 3,0-6,1 para cepas de *P. aeruginosa*. Quando os EHC e EHR foram combinados, os mesmos tiveram ação sinérgica em cepas clínicas de *A. baumannii* e não apresentaram essa ação contra *P. aeruginosa*. A ação sinérgica ocorre quando combinação dos extratos promove melhor ação do que quando isolados, essa interação permite o uso de doses mais baixas dos constituintes da combinação, situação que pode reduzir as reações adversas (Roell et al., 2017; Tallarida, 2011).

Em relação a atividade antibiofilme, o óleo essencial de canela teve efeito significativo (inibições da formação e redução do biofilme pré-formado) com valores de 47–81 e 30–62%, respectivamente, quando testados nas concentrações de 0,25-2 mg/mL contra cepas de *A. baumannii* (Ganic et al., 2022). A atividade antibiofilme do óleo essencial de canela também foi constatada por Wijesinghe et al. (2021), as concentrações mínimas de inibição de biofilme e erradicação do biofilme formado (MBIC₅₀ e MBEC) foram de 1,0 e 4,0 mg/mL para as cepas *P. aeruginosa*, *S. aureus* e *K. pneumoniae*. A microscopia eletrônica de varredura (MEV) indicou encolhimento celular, danos à parede celular e diminuição da densidade do biofilme (Wijesinghe et al., 2021). Estudos envolvendo a ação antibiofilme do EHC são escassos na literatura, porém nossos achados corroboram com estudos envolvendo o óleo essencial contra cepas de *A. baumannii* e *P. aeruginosa*. Nesse estudo, após tratamento de 24 h em biofilmes formados, as reduções da viabilidade foram de 72% para as cepas #Ab 2 e #Ab 3 quando em contato com o EHC. Em relação a ação profilática no qual inibe a formação do mesmo, o EHC inibiu em 95% a formação de biofilme da cepa #Ab 1, enquanto que *P. aeruginosa* teve 87,5% de inibição.

Em relação ao extrato de romã, o extrato hidroetanólico foi capaz de reduzir a formação de biofilme de *P. aeruginosa* em até 17–30%, quando testado a 10–50 µg/ml. Quando este extrato foi aplicado em biofilme pré-formado, ele poderia erradicar o biofilme em aproximadamente 15–19%; e a viabilidade do biofilme

(atividade metabólica medida pelo ensaio de MTT) foi reduzida em aproximadamente 13–22% (Joshi et al., 2019). Efeito antibiofilme também foi constatado em formulações enxaguatórios bucais contendo extrato da casca de *P. granatum*, a formulação resultou em uma perda de dureza superficial de 34,5% e 36%, após tratamento de 10 min, de biofilme de *S. mutans* e *C. albicans*, respectivamente (Fernandes et al., 2022). Em nosso estudo, essa atividade antibiofilme foi constatada contra cepas de *A. baumannii* e *P. aeruginosa*, EHR inibiu em 96% a formação de biofilme de *A. baumannii* H557, enquanto que *P. aeruginosa* teve 93% de inibição quando em contato com EHR. Após tratamento de 24 h em biofilmes formados, a redução da viabilidade foi de 83% para a cepa #Ab ATCC. Para *P. aeruginosa*, a redução da viabilidade chegou a 88,5% quando tratados com EHR.

Investigar os diferentes efeitos terapêuticos das plantas são essenciais, porém analisar sua toxicidade é primordial para que futuramente formulações possam fazer parte de tratamentos integrativos na área da saúde. A citotoxicidade do óleo de canela foi investigada por LeBel et al. (2017) e em concentrações eficazes contra *Solobacterium moorei*, manteve a viabilidade de queratinócitos gengivais após 1 hora de exposição (LeBel et al., 2017). Quando testado em células HaCaT, óleo essencial de *Mentha piperita* L. (100 µg/ml) resultou na viabilidade de aproximadamente 90% de células HaCaT, demonstrando propriedades não citotóxicas (Silva et al., 2021). A ausência de citotoxicidade em HaCat também foi constada no óleo de canela, quando testado em diferentes concentrações (0-1000 mg/mL) o óleo não apresentou toxicidade, indicando a natureza não tóxica do tratamento em células humanas (Wijesinghe et al., 2021), o que corrobora com os dados encontrados em nosso estudo utilizando também HaCat. As concentrações de EHC mantiveram viabilidade celular acima de 70% em todos os grupos tratados, não apresentando citotoxicidade na faixa de concentrações testadas, como recomendado pelas diretrizes do teste de toxicidade aguda (Cannella et al., 2019). Em relação ao extrato de romã, quando testado em HaCat, demonstrou ter concentrações seguras (25 e 50 µg/mL) apoiando sua utilização como cosmeceúticos naturais (Liu et al., 2019). Na faixa de concentração testada em nosso estudo 12,2-0,02 mg/mL não foi encontrado efeitos citotóxicos, demonstrando, assim, que essas concentrações são seguras quando testadas em células HaCat.

Esses achados são importantes para o desenvolvimento de futuros produtos seguros, tais como cremes dentais, enxaguantes bucais e/ou pomadas, que possam ser utilizados em tratamentos integrativos contra patógenos multirresistentes, sem efeitos tóxicos às células.

Como pode ser observado na literatura, a ação terapêutica de canela e romã apresenta relevância científica, no entanto, os estudos envolvendo os extratos hidroetanólicos ainda são escassos na literatura. Nosso estudo demonstrou uma potente ação antioxidante e antibacteriana dos EHC e EHR frente bactérias resistentes a antibióticos, tanto em cultura planctônica quanto em biofilmes, e sua ausência de citotoxicidade nas concentrações testadas. Diante desses resultados promissores, os EHC e EHR podem futuramente auxiliar no tratamento integrativo eficaz contra infecções causadas por esses patógenos resistentes.

7 CONCLUSÃO

De acordo com os resultados apresentados, pode-se concluir que:

- a) foram preparados extratos hidroetanólicos de canela e romã e tais produtos apresentam em sua composição fitocompostos, como flavonoides e fenóis, e picos de aldeído cinâmico (EHC), α -punicalagina e β -punicalagina (EHR) foram identificados após análise por HPLC. Além disso, demonstraram importante ação antioxidante, sendo o EHC o mais potente por apresentar menor concentração de CE_{50} ;
- b) os extratos avaliados apresentam importante ação antibacteriana para todas as cepas resistentes a antibióticos de *Acinetobacter baumannii* e *Pseudomonas aeruginosa* avaliadas, sendo os extratos isolados mais eficazes que em associação. Em adição, demonstraram ação antibiofilme, tanto sobre o processo de formação de biofilme quanto em biofilmes já formados;
- c) ambos extratos não apresentam efeito citotóxico para HaCat nas concentrações analisadas;

REFERÊNCIAS

- Aggarwal S, Bhadana K, Singh B, Rawat M, Mohammad T, Al-Keridis LA, et al. *Cinnamomum zeylanicum* extract and its bioactive component cinnamaldehyde show anti-tumor effects via inhibition of multiple cellular pathways. *Front Pharmacol*. 2022 Jun 2;13:918479. doi: 10.3389/fphar.2022.918479. PMID: 35774603; PMCID: PMC9237655
- AlBalawi AN, Elmetwalli A, Baraka DM, Alnagar HA, Alamri ES, Hassan MG. Chemical constituents, antioxidant potential, and antimicrobial efficacy of *pimpinella anisum* extracts against multidrug-resistant bacteria. *Microorganisms*. 2023 Apr 14;11(4):1024. doi: 10.3390/microorganisms11041024. PMID: 37110449; PMCID: PMC10144661
- Alkathiri B, El-Khadragy MF, Metwally DM, Al-Olayan EM, Bakhrebah MA, Abdel Moneim AE. Pomegranate (*Punica granatum*) juice shows antioxidant activity against cutaneous leishmaniasis-induced oxidative stress in female BALB/c Mice. *Int J Environ Res Public Health*. 2017 Dec 18;14(12):1592. doi: 10.3390/ijerph14121592. PMID: 29258248; PMCID: PMC5751009
- Al-Mariri A, Safi M. In vitro antibacterial activity of several plant extracts and oils against some gram-negative bacteria. *Irã J Med Sci*. 2014 Jan;39(1):36-43. PMID: 24453392; PMCID: PMC3895893.
- Alnimr AM, Alamri AM. Antimicrobial activity of cephalosporin-beta-lactamase inhibitor combinations against drug-susceptible and drug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* strains. *J Taibah Univ Med Sci*. 2020 May 12;15(3):203-210. doi: 10.1016/j.jtumed.2020.04.004. PMID: 32647515; PMCID: PMC7335999.
- Al-Said FA, Opara LU, Al-Yahyai RA. Physico-chemical and textural quality attributes of pomegranate cultivars (*Punica granatum* L.) grown in the sultanate of Oman. *J Food Eng*. 2009 Jan;90(1):129-134. doi: 10.1016/j.jfoodeng.2008.06.012
- Alves CQ, David JM, David JP, Bahia MV, Aguiar RM. Métodos para determinação de atividade antioxidante in vitro em substratos orgânicos. *Química Nova*. 2010;33(10): 2202-2210.
- Alviano DS, Alviano CS. Plant extracts: search for new alternatives to treat microbial diseases. *Curr Pharm Biotechnol*. 2009 Jan;10(1):106-21. doi: 10.2174/138920109787048607. PMID: 19149593.
- Alzoreky NS, Nakahara K. Antibacterial activity of extracts from some edible plants commonly consumed in Asia. *Int J Food Microbiol*. 2003 Feb 15;80(3):223-30. doi: 10.1016/s0168-1605(02)00169-1. PMID: 12423924

Amsterdam JD, Shults J, Soeller I, Mao JJ, Rockwell K, Newberg AB. Chamomile (*Matricaria recutita*) may provide antidepressant activity in anxious, depressed humans: an exploratory study. *Altern Ther Health Med*. 2012 Sep-Oct;18(5):44-9. PMID: 22894890; PMCID: PMC3600408.

Antunes LC, Visca P, Towner KJ. *Acinetobacter baumannii*: evolution of a global pathogen. *Pathog Dis*. 2014 Aug;71(3):292-301. doi: 10.1111/2049-632X.12125. Epub 2014 Jan 27. PMID: 24376225.

Aoki W, Ueda M. Characterization of antimicrobial peptides toward the development of novel antibiotics. *Pharmaceuticals (Basel)*. 2013 Aug 21;6(8):1055-81. doi: 10.3390/ph6081055. PMID: 24276381; PMCID: PMC3817730

Aparecida Procópio Gomes L, Alves Figueiredo LM, Luiza do Rosário Palma A, Corrêa Geraldo BM, Isler Castro KC, Ruano de Oliveira Fugisaki L et al. *Punica granatum* L. (Pomegranate) extract: in vivo study of antimicrobial activity against *Porphyromonas gingivalis* in *Galleria mellonella* model. *Sci. World J*. 2016: 8626987. doi: 10.1155/2016/8626987. Epub 2016 Sep 7. PMID: 27668280; PMCID: PMC5030419.

Aurilio C, Sansone P, Barbarisi M, Pota V, Giaccari LG, Coppolino F, et al. Mechanisms of action of carbapenem resistance. *Antibiotics (Basel)*. 2022 Mar 21;11(3):421. doi: 10.3390/antibiotics11030421. PMID: 35326884; PMCID: PMC8944602

Avershina E, Shapovalova V, Shipulin G. Fighting antibiotic resistance in hospital-acquired infections: current state and emerging technologies in disease prevention, diagnostics and therapy. *Front Microbiol*. 2021 Jul 21; 12:707330. doi: 10.3389/fmicb.2021.707330. PMID: 34367112; PMCID: PMC8334188

Babbar N, Oberoi HS, Sandhu SK, Bhargav VK. Influence of different solvents in extraction of phenolic compounds from vegetable residues and their evaluation as natural sources of antioxidants. *J Food Sci Technol*. (2014) 51:2568–75. doi: 10.1007/s13197-012-0754-4

Banoub NG, Saleh SE, Helal HS, Aboshanab KM. Antibiotics combinations and chitosan nanoparticles for combating multidrug resistance *Acinetobacter baumannii*. *Infect Drug Resist*. 2021 Aug 20; 14:3327-3339. doi: 10.2147/IDR.S328788. PMID: 34447258; PMCID: PMC8384262

Barbier F, Andremont A, Wolff M, Bouadma L. Hospital-acquired pneumonia and ventilator-associated pneumonia: recent advances in epidemiology and management. *Curr Opin Pulm Med*. 2013 May;19(3):216-28. doi: 10.1097/MCP.0b013e32835f27be. PMID: 23524477.

Bassetti M, Vena A, Croxatto A, Righi E, Guery B. How to manage *Pseudomonas aeruginosa* infections. *Drugs Context*. 2018 May 29;7:212527. doi: 10.7573/dic.212527. PMID: 29872449; PMCID: PMC5978525.

Bassolé IH, Juliani HR. Essential oils in combination and their antimicrobial properties. *Molecules*. 2012 Apr 2;17(4):3989-4006. doi: 10.3390/molecules17043989. PMID: 22469594; PMCID: PMC6268925.

Benchagra L, Berrougui H, Islam MO, Ramchoun M, Boulbaroud S, Hajjaji A, et al. Antioxidant effect of moroccan pomegranate (*Punica granatum* L. sefri variety) extracts rich in punicalagin against the oxidative stress process. *Foods*. 2021 Sep 18;10(9):2219. doi: 10.3390/foods10092219. PMID: 34574329; PMCID: PMC8469689

Boev C, Kiss E. Hospital-acquired infections: current trends and prevention. *Crit Care Nurs Clin North Am*. 2017 Mar;29(1):51-65. doi: 10.1016/j.cnc.2016.09.012. Epub 2016 Dec 22. PMID: 28160957

Boukamp P, Petrussevska RT, Breitkreutz D, Hornung J, Markham A, Fusenig NE. Normal keratinization in a spontaneously immortalized aneuploid human keratinocyte cell line. *J Cell Biol*. 1988 Mar;106(3):761-71. doi: 10.1083/jcb.106.3.761. PMID: 2450098; PMCID: PMC2115116.

Breidenstein EB, de la Fuente-Núñez C, Hancock RE. *Pseudomonas aeruginosa*: all roads lead to resistance. *Trends Microbiol*. 2011 Aug;19(8):419-26. doi: 10.1016/j.tim.2011.04.005. Epub 2011 Jun 12. PMID: 21664819.

Bueno PI, Machado D, Lancellotti M, Gonçalves CP, Marcucci MC, Sawaya ACHF, et al. In silico studies, chemical composition, antibacterial activity and in vitro antigen-induced phagocytosis of *Stryphnodendron adstringens* (Mart.) Coville. *RSD [Internet]*. 2022Jan.27 [cited 2023Jan.29];11(2):e35911225748. Available from: <https://rsdjournal.org/index.php/rsd/article/view/25748>

Bush K. Antimicrobial agents targeting bacterial cell walls and cell membranes. *Rev Sci Tech*. 2012 Apr;31(1):43-56. doi: 10.20506/rst.31.1.2096. PMID: 22849267.

Cannella V, Altomare R, Chiaramonte G, Di Bella S, Mira F, Russotto L, et al. Cytotoxicity evaluation of endodontic pins on L929 cell line. *Biomed Res Int*. 2019 Oct 30;2019:3469525. doi: 10.1155/2019/3469525. PMID: 31815131; PMCID: PMC6877943

Castro SB, Leal CA, Freire FR, Carvalho DA, Oliveira DF, Figueiredo HC. Antibacterial activity of plant extracts from Brazil against fish pathogenic bacteria. *Braz J Microbiol*. 2008 Oct;39(4):756-60. doi: 10.1590/S1517-838220080004000030. Epub 2008 Dec 1. PMID: 24031303; PMCID: PMC3768474

Chang ST, Chen PF, Chang SC. Antibacterial activity of leaf essential oils and their constituents from *Cinnamomum osmophloeum*. *J Ethnopharmacol*. 2001 Sep;77(1):123-7. doi: 10.1016/s0378-8741(01)00273-2. PMID: 11483389.

Chen YC, Qiu W, Zhang W, Zhang J, Chen R, Chen F, et al. A novel antimicrobial peptide sp-lecin with broad-spectrum antimicrobial activity and anti-*Pseudomonas aeruginosa* infection in zebrafish. *Int J Mol Sci*. 2022 Dec 23;24(1):267. doi: 10.3390/ijms24010267. PMID: 36613722; PMCID: PMC9820466

Cheurfa M, Achouche M, Azouzi A, Abdalbasit MA. Antioxidant and anti-diabetic activity of pomegranate (*Punica granatum* L.) leaves extracts. *Foods and Raw Materials*. 2020;8(2):329–336. DOI: <http://doi.org/10.21603/2308-4057-2020-2-329-336>

Chevalier S, Bouffartigues E, Bodilis J, Maillot O, Lesouhaitier O, Feuilloy MGJ, et al. Estrutura, função e regulação de porinas de *Pseudomonas aeruginosa*. *FEMS Microbiol Rev*. 2017 Set 1;41(5):698-722. DOI: 10.1093/femsre/fux020. PMID: 28981745.

Choi YS, Lee JS, Lee HG. Nanoencapsulation of grapefruit seed extract and cinnamon oil for oral health: preparation, in vitro, and clinical antimicrobial activities. *J Agric Food Chem*. 2023 Apr 12;71(14):5646-5654. doi: 10.1021/acs.jafc.2c05518. Epub 2023 Mar 29. PMID: 36988548.

Costerton JW, Stewart PS, Greenberg EP. Bacterial biofilms: a common cause of persistent infections. *Science*. 1999 May 21;284(5418):1318-22. doi: 10.1126/science.284.5418.1318. PMID: 10334980.

de Lima LB, da Silva WAV, Dos Santos ECF, Machado JCB, Procópio TF, de Moura MC, et al. Evaluation of antioxidant, antibacterial and enhancement of antibiotic action by *Punica granatum* leaves crude extract and enriched fraction against multidrug-resistant bacteria. *Chem Biodivers*. 2021 Dec;18(12):e2100538. doi: 10.1002/cbdv.202100538. Epub 2021 Oct 27. PMID: 34609784.

de Lima LB, Viturino da Silva WA, Silva SL, Felipe Dos Santos EC, Barbosa Machado JC, et al. Chemical and antibacterial analysis of *Cinnamomum verum* leaves extract and fractions against multidrug resistant bacteria. *Nat Prod Res*. 2022 May;36(10):2559-2564. doi: 10.1080/14786419.2021.1902323. Epub 2021 Mar 22. PMID: 33749459

de Oliveira JR, Antunes BS, do Nascimento GO, Kawall JCS, Oliveira JVB, Silva KGDS, et al. *Exp Biol Med* (Maywood). Antiviral activity of medicinal plant-derived products against SARS-CoV-2. *Out*;2022(247):20-1797. DOI: 1809.10/1177. Epub 15353702221108915 2022 de julho. PMID: 27; PMCID: PMC35894129.

Denkova-Kostova R, Teneva D, Tomova T, Goranov B, Denkova Z, Shopska V, et al. Chemical composition, antioxidant and antimicrobial activity of essential oils from tangerine (*Citrus reticulata* L.), grapefruit (*Citrus paradisi* L.), lemon (*Citrus lemon* L.) and cinnamon (*Cinnamomum zeylanicum* Blume). *Z Naturforsch C J Biosci*. 2020 Nov 23;76(5-6):175-185. doi: 10.1515/znc-2020-0126. PMID: 33909955

Dey D, Ray R, Hazra B. Antimicrobial activity of pomegranate fruit constituents against drug-resistant *Mycobacterium tuberculosis* and β -lactamase producing *Klebsiella pneumoniae*. *Pharm Biol*. 2015;53(10):1474-80. doi: 10.3109/13880209.2014.986687. Epub 2015 Apr 10. PMID: 25858784.

Dhingra S, Rahman NAA, Peile E, Rahman M, Sartelli M, Hassali MA, et al. Microbial resistance movements: an overview of global public health threats posed by antimicrobial resistance, and how best to counter. *Front Public Health*. 2020 Nov 4; 8:535668. doi: 10.3389/fpubh.2020.535668. PMID: 33251170; PMCID: PMC7672122.

Dolatabadi S, Moghadam HN, Mahdavi-Ourtakand M. Evaluating the anti-biofilm and antibacterial effects of *Juglans regia* L. extracts against clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa*. *Microb Pathog*. 2018 May;118:285-289. doi: 10.1016/j.micpath.2018.03.055. Epub 2018 Mar 29. PMID: 29605650.

Donlan RM, Costerton JW. Biofilms: survival mechanisms of clinically relevant microorganisms. *Clin Microbiol Rev*. 2002 Apr;15(2):167-93. doi: 10.1128/CMR.15.2.167-193.2002. PMID: 11932229; PMCID: PMC118068.

Drenkard E. Antimicrobial resistance of *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. *Microbes Infect*. 2003 Nov;5(13):1213-9. doi: 10.1016/j.micinf.2003.08.009. PMID: 14623017.

Dubale S, Kebebe D, Zeynudin A, Abdissa N, Suleman S. Phytochemical screening and antimicrobial activity evaluation of selected medicinal plants in Ethiopia. *J Exp Pharmacol*. 2023 Feb 8;15:51-62. doi: 10.2147/JEP.S379805. PMID: 36789235; PMCID: PMC9922502.

Dunne WM Jr. Bacterial adhesion: seen any good biofilms lately? *Clin Microbiol Rev*. 2002 Apr;15(2):155-66. doi: 10.1128/CMR.15.2.155-166.2002. PMID: 11932228; PMCID: PMC118072.

Eichenberger EM, Thaden JT. Epidemiology and mechanisms of resistance of extensively drug resistant gram-negative bacteria. *Antibiotics (Basel)*. 2019 Apr 6;8(2):37. doi: 10.3390/antibiotics8020037. PMID: 30959901; PMCID: PMC6628318.7

El-Mahallawy HA, Hassan SS, El-Wakil M, Moneer MM. Bacteremia due to ESKAPE pathogens: An emerging problem in cancer patients. *J Egypt Natl Canc Inst*. 2016 Sep;28(3):157-62. doi: 10.1016/j.jnci.2016.05.002. Epub 2016 Jun 3. PMID: 27268592.

El País. [Internet] Madri: El país [cited 2019 Mai 23]. Available from: https://brasil.elpais.com/brasil/2019/05/23/ciencia/1558635795_212524.html.

Erdal B, Yalınay M, Elmas Ç, Yazıcı GN. TPiperasilin/tazobaktam ve siprofloksasin sub-minimal inhibitör konsantrasyonlarında *Pseudomonas aeruginosa* biyofilm oluşumunun ve quorum sensing genlerinin araştırılması [Investigation of *Pseudomonas aeruginosa* biofilm formation and quorum sensing genes in piperacillin/tazobactam and ciprofloxacin sub-minimal inhibitory concentrations]. Mikrobiyol Bul. 2020 Oct;54(4):547-558. Turkish. doi: 10.5578/mb.70087. PMID: 33107284

Essid R, Hammami M, Gharbi D, Karkouch I, Hamouda TB, Elkahoui S, et al. Antifungal mechanism of the combination of *Cinnamomum verum* and *Pelargonium graveolens* essential oils with fluconazole against pathogenic *Candida strains*. Appl Microbiol Biotechnol. 2017 Sep;101(18):6993-7006. doi: 10.1007/s00253-017-8442-y. Epub 2017 Aug 1. PMID: 28766033.

Falzon CC, Balabanova A. Phytotherapy: an introduction to herbal medicine. Prim Care. 2017 Jun;44(2):217-227. doi: 10.1016/j.pop.2017.02.001. PMID: 28501226.

Fernandes GL, Vieira APM, Danelon M, Emerenciano NG, Berretta AA, Buszinski AFM, et al. Pomegranate extract potentiates the anti-demineralizing, anti-biofilm, and anti-inflammatory actions of non-alcoholic mouthwash when associated with sodium-fluoride trimetaphosphate. Antibiotics (Basel). 2022 Oct 25;11(11):1477. doi: 10.3390/antibiotics11111477. PMID: 36358132; PMCID: PMC9686636.

Fournier PE, Vallenet D, Barbe V, Audic S, Ogata H, Poirel L, et al. Genômica comparativa da multirresistência em *Acinetobacter baumannii*. PLoS Genet. 2006 Jan;2(1):e7. DOI: 10.1371/journal.pgen.0020007. Epub 2006 13 de janeiro. PMID: 16415984; PMCID: PMC1326220.

Fratini F, Mancini S, Turchi B, Friscia E, Pistelli L, Giusti G, et al. A novel interpretation of the fractional inhibitory concentration index: the case *origanum vulgare* L. and *Leptospermum scoparium* J. R. et G. Forst essential oils against *Staphylococcus aureus* strains. Microbiol Res. 2017 Jan;195:11-17. doi: 10.1016/j.micres.2016.11.005. Epub 2016 Nov 18. PMID: 28024521

Freitas CG, Staudt KJ, Khün KH, Alves IA, Meneghete MC. Prevalência de microrganismos em bandejas utilizadas pela enfermagem na administração de medicamentos em ambiente hospitalar. Ver Interdisciplin Cienc Saude e Biol. 2019;3(2):24–34. doi: 10.31512/ricsb.v3i2.3199

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 Oct 10;13:989667. doi: 10.3389/fmicb.2022.989667. PMID: 36299724; PMCID: PMC9589355.

Garzotto F, Comoretto RI, Ostermann M, Nalesso F, Gregori D, Bonavina MG, et al. Preventing infectious diseases in Intensive Care Unit by medical devices remote control: Lessons from COVID-19. J Crit Care. 2021 Feb;61:119-124. doi: 10.1016/j.jcrc.2020.10.014. Epub 2020 Oct 27. PMID: 33157307; PMCID: PMC7588313.

Gavanji S, Bakhtari A, Baghshahi H, Chamgordani ZH, Sadeghi A. Antibacterial effect of *Allium ampeloprasum* and *Allium porrum* extracts on *Staphylococcus aureus* and *Pseudomonas aeruginosa*. J Pharmacopuncture. 2023 Mar 31;26(1):53-59. doi: 10.3831/KPI.2023.26.1.53. PMID: 37007285; PMCID: PMC10063418.

Geng J, Dong J, Ni H, Lee MS, Wu T, Jiang K, et al. Ginseng for cognition. Cochrane Database Syst Rev. 2010 Dec 8;(12):CD007769. doi: 10.1002/14651858.CD007769.pub2. PMID: 21154383.

Gharbani P, Jam N, Doshmanfekan H, Mehrizad A. Optimization of synergic antibacterial activity of *Punica granatum* L. and *Areca nut* (P.G.L.A.N) extracts through response surface methodology. Sci Rep. 2023 Apr 13;13(1):6098. doi: 10.1038/s41598-023-32900-1. PMID: 37055420; PMCID: PMC10102241.

Gigliobianco MR, Cortese M, Nannini S, Di Nicolantonio L, Peregrina DV, Lupidi G, et al. Chemical, antioxidant, and antimicrobial properties of the peel and male flower by-products of four varieties of *Punica granatum* L. cultivated in the marche region for their use in cosmetic products. Antioxidants (Basel). 2022 Apr 12;11(4):768. doi: 10.3390/antiox11040768. PMID: 35453453; PMCID: PMC9030693.

Gil MI, Tomás-Barberán FA, Hess-Pierce B, Holcroft DM, Kader AA. Antioxidant activity of pomegranate juice and its relationship with phenolic composition and processing. J Agric Food Chem. 2000 Oct;48(10):4581-9. doi: 10.1021/jf000404a. PMID: 11052704.

Hamidian M, Blasco L, Tillman LN, To J, Tomas M, Myers GSA. Analysis of complete genome sequence of *Acinetobacter baumannii* strain ATCC 19606 reveals novel mobile genetic elements and novel prophage. Microorganisms. 2020 Nov 24;8(12):1851. doi: 10.3390/microorganisms8121851. PMID: 33255319; PMCID: PMC7760358.

Hancock RE, Speert DP. Antibiotic resistance in *Pseudomonas aeruginosa*: mechanisms and impact on treatment. Drug Resist Updat. 2000 Aug;3(4):247-255. doi: 10.1054/drup.2000.0152. PMID: 11498392.

Hill T, Jain VK, Iyengar KP. Antimicrobial peptides (AMP) in biofilm induced orthopaedic device-related infections. J Clin Orthop Trauma. 2022 Jan 26;25:101780. doi: 10.1016/j.jcot.2022.101780. PMID: 35145849; PMCID: PMC8814372.

Houston DM, Bugert J, Denyer SP, Heard CM. Anti-inflammatory activity of *Punica granatum* L. (Pomegranate) rind extracts applied topically to ex vivo skin. Eur J Pharm Biopharm. 2017 Mar;112:30-37. doi: 10.1016/j.ejpb.2016.11.014. Epub 2016 Nov 17. PMID: 27867111.

Ibrahim S, Al-Saryi N, Al-Kadmy IMS, Aziz SN. Multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* as an emerging concern in hospitals. Mol Biol Rep. 2021 Oct;48(10):6987-6998. doi: 10.1007/s11033-021-06690-6. Epub 2021 Aug 30. PMID: 34460060; PMCID: PMC8403534.

Imran M, Khan AS, Khan MA, Saeed MU, Noor N, Warsi MH, et al. Antimicrobial activity of different plants extracts against *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli*. Polim Med. 2021 Jul-Dec;51(2):69-75. doi: 10.17219/pim/143424. PMID: 34783203.

Jalali A, Kiafar M, Seddigh M, Zarshenas MM. *Punica granatum* as a source of natural antioxidant and antimicrobial agent: a comprehensive review on related investigations. Curr Drug Discov Technol. 2021;18(2):207-224. doi: 10.2174/1570163817666200430001822. PMID: 32351184.

Jam N, Hajimohammadi R, Gharbani P, Mehrizad A. Antibacterial activity of *Punica granatum* L. and *Areca nut* (P.A) combined extracts against some food born pathogenic bacteria. Saudi J Biol Sci. 2022 Mar;29(3):1730-1736. doi: 10.1016/j.sjbs.2021.10.057. Epub 2021 Oct 25. PMID: 35280537; PMCID: PMC8913389.

Jaśkiewicz M, Neubauer D, Kazor K, Bartoszewska S, Kamysz W. Antimicrobial activity of selected antimicrobial peptides against planktonic culture and biofilm of *Acinetobacter baumannii*. Probiotics Antimicrob Proteins. 2019 Mar;11(1):317-324. doi: 10.1007/s12602-018-9444-5. PMID: 30043322; PMCID: PMC6449538.

Jayaprakasha GK, Rao LJ, Sakariah KK. Chemical composition of volatile oil from *Cinnamomum zeylanicum* buds. Z Naturforsch C J Biosci. 2002 Nov-Dec;57(11-12):990-3. doi: 10.1515/znc-2002-11-1206. PMID: 12562082.

Jing P, Ye T, Shi H, Sheng Y, Slavin M, Gao B, et al. Antioxidant properties and phytochemical composition of China-grown pomegranate seeds. Food Chem. 2012;132(3):1457–1464. doi: 10.1016/j.foodchem.2011.12.002.

Joshi C, Patel P, Kothari V. Anti-infective potential of hydroalcoholic extract of *Punica granatum* peel against gram-negative bacterial pathogens. F1000Res. 2019 Jan 18;8:70. doi: 10.12688/f1000research.17430.2. PMID: 30828441; PMCID: PMC6392158.

Julianti E, Rajah KK, Fidrianny I. Antibacterial activity of ethanolic extract of *Cinnamon* bark, honey, and their combination effects against acne-causing bacteria. Sci Pharm. 2017 Apr 11;85(2):19. doi: 10.3390/scipharm85020019. PMID: 28398231; PMCID: PMC5489923.

Khameneh B, Iranshahy M, Soheili V, Fazly Bazzaz BS. Review on plant antimicrobials: a mechanistic viewpoint. Antimicrob Resist Infect Control. 2019 Jul 16;8:118. doi: 10.1186/s13756-019-0559-6. PMID: 31346459; PMCID: PMC6636059.

Khan I, Rahman H, Abd El-Salam NM, Tawab A, Hussain A, Khan TA, et al. *Punica granatum* peel extracts: HPLC fractionation and LC MS analysis to quest compounds having activity against multidrug resistant bacteria. BMC Complement Altern Med. 2017 May 3;17(1):247. doi: 10.1186/s12906-017-1766-4. PMID: 28468660; PMCID: PMC5415797.

Kim SW. Phytotherapy: emerging therapeutic option in urologic disease. *Transl Androl Urol*. 2012 Sep;1(3):181-91. doi: 10.3978/j.issn.2223-4683.2012.05.10. PMID: 26816707; PMCID: PMC4708250.

Kritis P, Karampela I, Kokoris S, Dalamaga M. The combination of bromelain and curcumin as an immune-boosting nutraceutical in the prevention of severe COVID-19. *Metabol Open*. 2020 Dec;8:100066. doi: 10.1016/j.metop.2020.100066. Epub 2020 Nov 13. PMID: 33205039; PMCID: PMC7661945.

Kumar VP, Chauhan NS, Padh H, Rajani M. Search for antibacterial and antifungal agents from selected Indian medicinal plants. *J Ethnopharmacol*. 2006 Sep 19;107(2):182-8. doi: 10.1016/j.jep.2006.03.013. Epub 2006 Mar 27. PMID: 16678369

Kyriakidis I, Vasileiou E, Pana ZD, Tragiannidis A. *Acinetobacter baumannii* antibiotic resistance mechanisms. *Pathogens*. 2021 Mar 19;10(3):373. doi: 10.3390/pathogens10030373. PMID: 33808905; PMCID: PMC8003822.

Larsson DGJ, Flach CF. Antibiotic resistance in the environment. *Nat Rev Microbiol*. 2022 May;20(5):257-269. doi: 10.1038/s41579-021-00649-x. Epub 2021 Nov 4. PMID: 34737424; PMCID: PMC8567979.

Lebel G, Haas B, Adam AA, Veilleux MP, Lagha AB, 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 Nov;83:97-104. doi: 10.1016/j.archoralbio.2017.07.005. Epub 2017 Jul 12. PMID: 28743086.

Lee SC, Wang SY, Li CC, Liu CT. Anti-inflammatory effect of cinnamaldehyde and linalool from the leaf essential oil of *Cinnamomum osmophloeum* Kanehira in endotoxin-induced mice. *J Food Drug Anal*. 2018 Jan;26(1):211-220. doi: 10.1016/j.jfda.2017.03.006. Epub 2017 Apr 19. PMID: 29389558; PMCID: PMC9332676.

Li W, Zhou J, Xu Y. Study of the *in vitro* cytotoxicity testing of medical devices. *Biomed Rep*. 2015 Sep;3(5):617-620. doi: 10.3892/br.2015.481. Epub 2015 Jun 19. PMID: 26405534; PMCID: PMC4535150.

Lim KJA, Cabajar AA, Lobarbio CFY, Taboada EB, Lacks DJ. Extraction of bioactive compounds from mango (*Mangifera indica* L. var. Carabao) seed kernel with ethanol-water binary solvent systems. *J Food Sci Technol*. 2019 May;56(5):2536-2544. doi: 10.1007/s13197-019-03732-7. Epub 2019 Apr 1. PMID: 31168135; PMCID: PMC6525705.

Liu C, Guo H, DaSilva NA, Li D, Zhang K, Wan Y, et al. Pomegranate (*Punica granatum*) phenolics ameliorate hydrogen peroxide-induced oxidative stress and cytotoxicity in human keratinocytes. *J Funct Foods*. 2019 Mar;54:559-567. doi: 10.1016/j.jff.2019.02.015. Epub 2019 Feb 11. PMID: 34079588; PMCID: PMC8168454.

Lopatkin AJ, Bening SC, Manson AL, Stokes JM, Kohanski MA, Badran AH, et al. Clinically relevant mutations in core metabolic genes confer antibiotic resistance. *Science*. 2021 Feb 19;371(6531):eaba0862. doi: 10.1126/science.aba0862. PMID: 33602825; PMCID: PMC8285040.

Magiorakos AP, Srinivasan A, Carey RB, Carmeli Y, Falagas ME, Giske CG, et al. Multidrug-resistant, extensively drug-resistant and pandrug-resistant bacteria: an international expert proposal for interim standard definitions for acquired resistance. *Clin Microbiol Infect*. 2012 Mar;18(3):268-81. doi: 10.1111/j.1469-0691.2011.03570.x. Epub 2011 Jul 27. PMID: 21793988.

Mahlo SM, Chauke HR, McGaw L, Eloff J. Antioxidant and antifungal activity of selected medicinal plant extracts against phytopathogenic fungi. *Afr J Tradit Complement Altern Med*. 2016 Jul 3;13(4):216-222. doi: 10.21010/ajtcam.v13i4.28. PMID: 28852739; PMCID: PMC5566147

Marcucci MC, Salatino A, Oliveira LFAM, Gonçalves CP. Metodologias acessíveis para a quantificação de flavonoides e fenóis totais em própolis. *Rev Virtual Quim*. 2021;13(1). doi: 10.21577/1984-6835.20200131. Epub 2020 Nov 17

Marjanović-Balaban Ž, Stanojević L, Kalaba V, Stanojević J, Cvetković D, Cakić M, et al. Chemical composition and antibacterial activity of the essential oil of *Mentha piperita* L. *Qual Life*. 2018;9:5–12. doi: 10.7251/QOL1801005M.

Marques FM, da Costa MR, Vittorazzi C, Gramma LDS, Barth T, de Andrade TU, et al. In vitro and in vivo anti-inflammatory effects of *Struthanthus vulgaris*. *Planta Med*. 2017 Jun;83(9):770-777. doi: 10.1055/s-0043-101916. Epub 2017 Jan 30. PMID: 28135738

Marturano JE, Lowery TJ. ESKAPE Pathogens in bloodstream infections are associated with higher cost and mortality but can be predicted using diagnoses upon admission. *Open Forum Infect Dis*. 2019 Nov 22;6(12):ofz503. doi: 10.1093/ofid/ofz503. PMID: 31844639; PMCID: PMC6902016.

Masuku M, Mozirandi W, Mukanganyama S. Evaluation of the antibacterial and antibiofilm effects of ethyl acetate root extracts from *Vernonia adoensis* (Asteraceae) against *Pseudomonas aeruginosa*. *Sci. World J*. 2023 Jun 6;2023:5782656. doi: 10.1155/2023/5782656. PMID: 37324654; PMCID: PMC10264714.

Matan N, Rimkeeree H, Mawson AJ, Chompreeda P, Haruthaithanasan V, Parker M. Antimicrobial activity of cinnamon and clove oils under modified atmosphere conditions. *Int J Food Microbiol*. 2006 Mar 15;107(2):180-5. doi: 10.1016/j.ijfoodmicro.2005.07.007. Epub 2005 Nov 2. PMID: 16266767.

Mathew S, Abraham TE. In vitro antioxidant activity and scavenging effects of *Cinnamomum verum* leaf extract assayed by different methodologies. *Food Chem Toxicol*. 2006 Feb;44(2):198-206. doi: 10.1016/j.fct.2005.06.013. Epub 2005 Aug 8. PMID: 16087283.

Miyakis S, Pefanis A, Tsakris A. The challenges of antimicrobial drug resistance in Greece. *Clin Infect Dis*. 2011 Jul 15;53(2):177-84. doi: 10.1093/cid/cir323. PMID: 21690626.

Modaeinama S, Abasi M, Abbasi MM, Jahanban-Esfahlan R. Anti-Tumoral properties of *Punica Granatum* (Pomegranate) peel extract on different human cancer cells. *Asian Pac J Cancer Prev*. 2015;16(14):5697-701. doi: 10.7314/apjcp.2015.16.14.5697. PMID: 26320438.

Morris FC, Dexter C, Kostoulas X, Uddin MI, Peleg AY. The Mechanisms of disease caused by *Acinetobacter baumannii*. *Front Microbiol*. 2019 Jul 17;10:1601. doi: 10.3389/fmicb.2019.01601. PMID: 31379771; PMCID: PMC6650576.

Morita Y, Tomida J, Kawamura Y. Responses of *Pseudomonas aeruginosa* to antimicrobials. *Front Microbiol*. 2014 Jan 8;4:422. doi: 10.3389/fmicb.2013.00422. PMID: 24409175; PMCID: PMC3884212.

Munoz-Price LS, Weinstein RA. *Acinetobacter* infection. *N Engl J Med*. 2008 Mar 20;358(12):1271-81. doi: 10.1056/NEJMra070741. Review. PubMed PMID: 18354105.

Mutlu M, Bingol Z, Uc EM, Köksal E, Goren AC, Alwasel SH, et al. Comprehensive metabolite profiling of Cinnamon (*Cinnamomum zeylanicum*) leaf oil using LC-HR/MS, GC/MS, and GC-FID: determination of antiglaucoma, antioxidant, anticholinergic, and antidiabetic profiles. *Life (Basel)*. 2023 Jan 3;13(1):136. doi: 10.3390/life13010136. PMID: 36676085; PMCID: PMC9865886.

Nawaz A, Ali T, Naeem M, Hussain F, Li Z, Nasir A. Biochemical, structural characterization and in-vitro evaluation of antioxidant, antibacterial, cytotoxic, and antidiabetic activities of nanosuspensions of *Cinnamomum zeylanicum* bark extract. *Front Chem*. 2023 May 5;11:1194389. doi: 10.3389/fchem.2023.1194389. PMID: 37214484; PMCID: PMC10196027.

Nogbou ND, Mabela DR, Matseke B, Mapfumari NS, Mothibe ME, Obi LC, et al. Antibacterial activities of *Monsonia Angustifolia* and *Momordica Balsamina* linn extracts against carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii*. *Plants (Basel)*. 2022 Sep 12;11(18):2374. doi: 10.3390/plants11182374. PMID: 36145776; PMCID: PMC9503486.

Nordmann P, Poirel L. Epidemiology and diagnostics of carbapenem resistance in gram-negative bacteria. *Clin Infect Dis*. 2019 Nov 13;69(Suppl 7):S521-S528. doi: 10.1093/cid/ciz824. PMID: 31724045; PMCID: PMC6853758.

Ozkan M. Degradation of anthocyanins in sour cherry and pomegranate juices by hydrogen peroxide in the presence of added ascorbic acid. *Food Chem*. 2002;78:499–504.

Orak H H, Yagar H, Isbilir S S. Comparison of antioxidant activities of juice, peel, and seed of pomegranate (*Punica granatum* L.) and inter-relationships with total phenolic, Tannin, anthocyanin, and flavonoid contents. Food Sci Biotechnol. 2012;21(2):373–87. doi: 10.1007/s10068-012-0049-6

Pagliari S, Forcella M, Lonati E, Sacco G, Romaniello F, Rovellini P, et al. Antioxidant and anti-Inflammatory effect of cinnamon (*Cinnamomum verum* J. Presl) bark extract after in vitro digestion simulation. Foods. 2023 Jan 18;12(3):452. doi: 10.3390/foods12030452. PMID: 36765979; PMCID: PMC9914695.

Pang Z, Raudonis R, Glick BR, Lin TJ, Cheng Z. Antibiotic resistance in *Pseudomonas aeruginosa*: mechanisms and alternative therapeutic strategies. Biotechnol Adv. 2019 Jan-Feb;37(1):177-192. doi: 10.1016/j.biotechadv.2018.11.013. Epub 2018 Nov 27. PMID: 30500353.

Pavela R, Maggi F, Iannarelli R, Benelli G. Extratos vegetais para o desenvolvimento de larvicidas de mosquitos: do laboratório ao campo, com insights sobre os modos de ação. Acta Trop. 2019 May;193:236-271. DOI: 10.1016/j.actatropica.2019.01.019. Epub 2019 31 de janeiro. PMID: 30711422

Peleg AY, Seifert H, Paterson DL. *Acinetobacter baumannii*: emergence of a successful pathogen. Clin Microbiol Rev. 2008 Jul;21(3):538-82. doi: 10.1128/CMR.00058-07. PMID: 18625687; PMCID: PMC2493088.

Peleg AC, Palmieri M, Mirande C, Oliver A, Moons P, Goossens H, van Belkum A. *Pseudomonas aeruginosa*: a clinical and genomics update. FEMS Microbiol Rev. 2021 Nov 23;45(6):fuab026. doi: 10.1093/femsre/fuab026. PMID: 33970247.

Pereira TC, de Menezes RT, de Oliveira HC, de Oliveira LD, Scorzoni L. In vitro synergistic effects of fluoxetine and paroxetine in combination with amphotericin B against *Cryptococcus neoformans*. Pathog Dis. 2021 Feb 19;79(2):ftab001. doi: 10.1093/femspd/ftab001. PMID: 33417701.

Peterson DW, George RC, Scaramozzino F, LaPointe NE, Anderson RA, Graves DJ, et al. Cinnamon extract inhibits tau aggregation associated with Alzheimer's disease in vitro. J Alzheimers Dis. 2009;17(3):585-97. doi: 10.3233/JAD-2009-1083. PMID: 19433898.

Petkovska A, Gjamovski V, Stefova M. Comparison of different extraction solvents for assay of the polyphenol content in the peel and pulp of 21 apple cultivars from Macedonia. Maced J Chem Chem Eng 2016;35(1):29-38. doi: 10.20450/mjcce.2016.871

Preda VG, Săndulescu O. Communication is the key: biofilms, quorum sensing, formation and prevention. Discoveries (Craiova). 2019 Sep 30;7(3):e100. doi: 10.15190/d.2019.13. PMID: 32309618; PMCID: PMC7086079.

Priebe GP, Goldberg JB. Vaccines for *Pseudomonas aeruginosa*: a long and winding road. *Expert Rev Vaccines*. 2014 Apr;13(4):507-19. doi: 10.1586/14760584.2014.890053. Epub 2014 Feb 27. PMID: 24575895; PMCID: PMC4521563.

Pokharel K, Dawadi BR, Shrestha LB. Role of biofilm in bacterial infection and antimicrobial resistance. *JNMA J Nepal Med Assoc*. 2022 Sep 1;60(253):836-840. doi: 10.31729/jnma.7580. PMID: 36705135; PMCID: PMC9794942.

Rao PV, Gan SH. Cinnamon: a multifaceted medicinal plant. *Evid Based Complement Alternat Med*. 2014;2014:642942. doi: 10.1155/2014/642942. Epub 2014 Apr 10. PMID: 24817901; PMCID: PMC4003790.

Rice LB. Federal funding for the study of antimicrobial resistance in nosocomial pathogens: no ESKAPE. *J Infect Dis*. 2008 Apr 15;197(8):1079-81. doi: 10.1086/533452. PMID: 18419525.

Roell KR, Reif DM, Motsinger-Reif AA. An introduction to terminology and methodology of chemical synergy-perspectives from across disciplines. *Front Pharmacol*. 2017 Apr 20;8:158. doi: 10.3389/fphar.2017.00158. PMID: 28473769; PMCID: PMC5397413.

Roy R, Tiwari M, Donelli G, Tiwari V. Strategies for combating bacterial biofilms: A focus on anti-biofilm agents and their mechanisms of action. *Virulence*. 2018 Jan 1;9(1):522-554. doi: 10.1080/21505594.2017.1313372. PMID: 28362216; PMCID: PMC5955472.

Sabraoui T, Khider T, Nasser B, Eddoha R, Moujahid A, Benbachir M, et al. Determination of punicalagins content, metal chelating, and antioxidant properties of edible pomegranate (*Punica granatum* L) peels and seeds grown in Morocco. *Int J Food Sci*. 2020 Sep 17;2020:8885889. doi: 10.1155/2020/8885889. PMID: 33029486; PMCID: PMC7528098.

Sadikot RT, Blackwell TS, Christman JW, Prince AS. Pathogen-host interactions in *Pseudomonas aeruginosa* pneumonia. *Am J Respir Crit Care Med*. 2005 Jun 1;171(11):1209-23. doi: 10.1164/rccm.200408-1044SO. Epub 2005 Feb 1. PMID: 15695491; PMCID: PMC2718459.

Salma U, Saha SK, Sultana S, Ahmed SM, Haque SD, Mostaqim S. The antibacterial activity of ethanolic extract of cinnamon (*Cinnamomum zeylanicum*) against two food borne pathogens: *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli*. *Mymensingh Med J*. 2019 Oct;28(4):767-772. PMID: 31599239.

Santos PBDRED, Ávila DDS, Ramos LP, Yu AR, Santos CEDR, 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 Aug;36(7):834-845. doi: 10.1080/08927014.2020.1823972. Epub 2020 Sep 21. PMID: 32954805.

Saparbekova AA, Kantureyeva GO, Kudasova DE, Konarbayeva ZK, Latif AS. Potential of phenolic compounds from pomegranate (*Punica granatum* L.) by-product with significant antioxidant and therapeutic effects: A narrative review. Saudi J Biol Sci. 2023 Feb;30(2):103553. doi: 10.1016/j.sjbs.2022.103553. Epub 2022 Dec 28. PMID: 36632073; PMCID: PMC9827386.

Schink A, Naumoska K, Kitanovski Z, Kampf CJ, Fröhlich-Nowoisky J, Thines E, et al. Anti-inflammatory effects of cinnamon extract and identification of active compounds influencing the TLR2 and TLR4 signaling pathways. Food Funct. 2018 Nov 14;9(11):5950-5964. doi: 10.1039/c8fo01286e. PMID: 30379176.

Sharma K, Kesharwani P, Prajapati SK, Jain A, Jain D, Mody N, et al. An insight into anticancer bioactives from *Punica granatum* (Pomegranate). Anticancer Agents Med Chem. 2022;22(4):694-702. doi: 10.2174/1871520621666210726143553. PMID: 34315399.

Shaygannia E, Bahmani M, Zamanzad B, Rafieian-Kopaei M. A review study on *Punica granatum* L. J Evid Based Complementary Altern Med. 2016 Jul;21(3):221-7. doi: 10.1177/2156587215598039. Epub 2015 Jul 30. PMID: 26232244.

Sikora A, Zahra F. Nosocomial Infections. [Updated 2022 Sep 23]. In: StatPearls [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2022 Jan-. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK559312/>

Sineh Sepehr K, Baradaran B, Mazandarani M, Khor V, Shahneh FZ. Studies on the cytotoxic activities of *Punica granatum* L. var. spinosa (apple punice) extract on prostate cell line by induction of apoptosis. ISRN Pharm. 2012;2012:547942. doi: 10.5402/2012/547942. Epub 2012 Dec 17. PMID: 23320197; PMCID: PMC3539436.

Singh RP, Chidambara Murthy KN, Jayaprakasha GK. Studies on the antioxidant activity of pomegranate (*Punica granatum*) peel and seed extracts using in vitro models. J Agric Food Chem. 2002 Jan 2;50(1):81-6. doi: 10.1021/jf010865b. PMID: 11754547.

Singh R, Koppikar SJ, Paul P, Gilda S, Paradkar AR, Kaul-Ghanekar R. Comparative analysis of cytotoxic effect of aqueous cinnamon extract from *Cinnamomum zeylanicum* bark with commercial cinnamaldehyde on various cell line. Pharm Biol. 2009;47(12):1174-9. doi: 10.3109/13880200903019242

Singh R, Capalash N, Sharma P. Vaccine development to control the rising scourge of antibiotic-resistant *Acinetobacter baumannii*: a systematic review. 3 Biotech. 2022 Mar;12(3):85. doi: 10.1007/s13205-022-03148-9. Epub 2022 Mar 2. PMID: 35261870; PMCID: PMC8890014

Silva WMF, Bona NP, Pedra NS, Cunha KFD, Fiorentini AM, Stefanello FM, et al. Risk assessment of in vitro cytotoxicity, antioxidant and antimicrobial activities of *Mentha piperita* L. essential oil. J Toxicol Environ Health A. 2022 Mar 19;85(6):230-242. doi: 10.1080/15287394.2021.1999875. Epub 2021 Nov 15. PMID: 34781835.

Silva-Boghossian CM, Neves AB, Resende FA, Colombo AP. Suppuration-associated bacteria in patients with chronic and aggressive periodontitis. *J Periodontol*. 2013 Sep;84(9):e9-e16. doi: 10.1902/jop.2013.120639. Epub 2013 Jan 17. PMID: 23327648.

Sousa SA, Seixas AMM, Marques JMM, Leitão JH. Immunization and immunotherapy approaches against *Pseudomonas aeruginosa* and *Burkholderia cepacia* complex infections. *Vaccines (Basel)*. 2021 Jun 18;9(6):670. doi: 10.3390/vaccines9060670. PMID: 34207253; PMCID: PMC8234409.

Tacconelli E, Carrara E, Savoldi A, Harbarth S, Mendelson M, Monnet DL, et al. Discovery, research, and development of new antibiotics: the WHO priority list of antibiotic-resistant bacteria and tuberculosis. *Lancet Infect Dis*. 2018 Mar;18(3):318-327. doi: 10.1016/S1473-3099(17)30753-3. Epub 2017 Dec 21. PMID: 29276051.

Talib WH, Mahasneh AM. Antimicrobial, cytotoxicity and phytochemical screening of Jordanian plants used in traditional medicine. *Molecules*. 2010 Mar 12;15(3):1811-24. doi: 10.3390/molecules15031811. PMID: 20336015; PMCID: PMC6257285.

Tallarida RJ. Quantitative methods for assessing drug synergism. *Genes Cancer*. 2011 Nov;2(11):1003-8. doi: 10.1177/1947601912440575. PMID: 22737266; PMCID: PMC3379564.

Thaden JT, Park LP, Maskarinec SA, Ruffin F, Fowler VG, van Duin D. Results from a 13-year prospective cohort study show increased mortality associated with bloodstream infections caused by *Pseudomonas aeruginosa* compared to other bacteria. *Antimicrob Agents and Chemother*. 2017;61(6):1–11. doi: 10.1128/AAC.02671-16

Trabelsi A, El Kaibi MA, Abbassi A, Horchani A, Chekir-Ghedira L, Ghedira K. Phytochemical study and antibacterial and antibiotic modulation activity of *Punica granatum* (pomegranate) leaves. *Scientifica (Cairo)*. 2020 Mar 26;2020:8271203. doi: 10.1155/2020/8271203. PMID: 32318311; PMCID: PMC7150692.

Ušjak D, Ivković B, Božić DD, Bošković L, Milenković M. Antimicrobial Activity of novel chalcones and modulation of virulence factors in hospital strains of *Acinetobacter baumannii* and *Pseudomonas aeruginosa*. *Microb Pathog*. 2019 Apr 10;131:186-196. doi: 10.1016/j.micpath.2019.04.015. [Epub ahead of print] PubMed PMID: 30980878.

Vandenheuvel D, Lavigne R, Brüssow H. Bacteriophage therapy: advances in formulation strategies and human clinical trials. *Annu Rev Virol*. 2015 Nov;2(1):599-618. doi: 10.1146/annurev-virology-100114-054915. PMID: 26958930.

Vangalapati M, Sree Satya N, Surya Prakash D, Avanigadda S. A review on pharmacological activities and clinical effects of cinnamon species. *Res. J. Pharm. Biol. Chem. Sci*. 2012;3(1):653–663

Vaou N, Stavropoulou E, Voidarou C, Tsigalou C, Bezirtzoglou E. Towards advances in medicinal plant antimicrobial activity: a review study on challenges and future perspectives. *Microorganisms*. 2021 Sep 27;9(10):2041. doi: 10.3390/microorganisms9102041. PMID: 34683362; PMCID: PMC8541629.

Vasconcelos NG, Croda J, Simionatto S. Antibacterial mechanisms of cinnamon and its constituents: A review. *Microb Pathog*. 2018 Jul;120:198-203. doi: 10.1016/j.micpath.2018.04.036. Epub 2018 Apr 24. PMID: 29702210.

Veiga RS, De Mendonça S, Mendes PB, Paulino N, Mimica MJ, Lagareiro Netto AA, et al. Artepillin C and phenolic compounds responsible for antimicrobial and antioxidant activity of green propolis and *Baccharis dracunculifolia* DC. *J Appl Microbiol*. 2017 Apr;122(4):911-920. doi: 10.1111/jam.13400. PMID: 28066967.

Vrancianu CO, Gheorghe I, Czobor IB, Chifiriuc MC. Antibiotic resistance profiles, molecular mechanisms and innovative treatment strategies of *Acinetobacter baumannii*. *Microorganisms*. 2020 Jun 21;8(6):935. doi: 10.3390/microorganisms8060935. PMID: 32575913; PMCID: PMC7355832.

Wang L, Hu C, Shao L. The antimicrobial activity of nanoparticles: present situation and prospects for the future. *Int J Nanomedicine*. 2017 Feb 14;12:1227-1249. doi: 10.2147/IJN.S121956. PMID: 28243086; PMCID: PMC5317269.

Wiegand C, Hipler UC. Evaluation of biocompatibility and cytotoxicity using keratinocyte and fibroblast cultures. *Skin Pharmacol Physiol*. 2009;22(2):74-82. doi: 10.1159/000178866. Epub 2009 Feb 4. PMID: 19188755.

Wijesinghe GK, Feiria SB, Maia FC, Oliveira TR, Joia F, Barbosa JP, et al. In-vitro antibacterial and antibiofilm activity of *Cinnamomum verum* leaf oil against *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus* and *Klebsiella pneumoniae*. *An Acad Bras Cienc*. 2021 Feb 24;93(1):e20201507. doi: 10.1590/0001-3765202120201507. PMID: 33656062.

Wilson VG. Growth and differentiation of HaCaT keratinocytes. *Methods Mol Biol*. 2014;1195:33-41. doi: 10.1007/7651_2013_42. PMID: 24155234.

Yang CH, Su PW, Moi SH, Chuang LY. Biofilm Formation in *Acinetobacter Baumannii*: Genotype-Phenotype Correlation. *Molecules*. 2019 May 14;24(10):1849. doi: 10.3390/molecules24101849. PMID: 31091746; PMCID: PMC6572253.

Yeh HF, Luo CY, Lin CY, Cheng SS, Hsu YR, Chang ST. Methods for thermal stability enhancement of leaf essential oils and their main constituents from indigenous cinnamon (*Cinnamomum osmophloeum*). *J Agric Food Chem*. 2013 Jul 3;61(26):6293-8. doi: 10.1021/jf401536y. Epub 2013 Jun 18. PMID: 23738884

Zarfeshany A, Asgary S, Javanmard SH. Potent health effects of pomegranate. *Adv Biomed Res*. 2014 Mar 25;3:100. doi: 10.4103/2277-9175.129371. PMID: 24800189; PMCID: PMC4007340.

Zhao T, Li C, Wang S, Song X. Green Tea (*Camellia sinensis*): A Review of Its Phytochemistry, Pharmacology, and Toxicology. *Molecules*. 2022 Jun 18;27(12):3909. doi: 10.3390/molecules27123909. PMID: 35745040; PMCID: PMC9231383.

Zhang QW, Lin LG, Ye WC. Techniques for extraction and isolation of natural products: a comprehensive review. *Chin Med*. 2018 Apr 17;13:20. doi: 10.1186/s13020-018-0177-x. PMID: 29692864; PMCID: PMC5905184.