



UNIVERSIDADE FEDERAL DE OURO PRETO

CAMPUS MORRO DO CRUZEIRO

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM
CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS



PPG CiPharma
Programa de Pós-Graduação
em Ciências Farmacêuticas

Larissa Silva Sampaio

Avaliação da microbiota facial humana e propriedades prebióticas dos extratos vegetais da *Annona crassiflora* e *Mangifera indica* e incorporação dos extratos em um produto cosmético

Ouro Preto

2022

Larissa Silva Sampaio

Avaliação da microbiota facial humana e propriedades prebióticas dos extratos vegetais da *Annona crassiflora* e *Mangifera indica* e incorporação dos extratos em um produto cosmético

Dissertação de mestrado apresentada ao curso de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas

Universidade Federal de Ouro Preto

Orientador: Prof. Dr. Orlando David Henrique dos Santos

Colaboradores: Gustavo Henrique Bianco e Luís Fernando Medeiros Teixeira

Ouro Preto

2022

SISBIN - SISTEMA DE BIBLIOTECAS E INFORMAÇÃO

S192a Sampaio, Larissa Silva.

Avaliação da microbiota facial humana e propriedades prebióticas dos extratos vegetais da *Annona crassiflora* e *Mangifera indica* e incorporação dos extratos em um produto cosmético. [manuscrito] / Larissa Silva Sampaio. - 2022.

75 f.: il.: color., gráf., tab..

Orientador: Prof. Dr. Orlando David Henrique dos Santos.

Dissertação (Mestrado Acadêmico). Universidade Federal de Ouro Preto. Escola de Farmácia. Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas.

Área de Concentração: Fármacos e Medicamentos.

1. Cosméticos. 2. Microbiota. 3. Prebióticos. 4. *Mangifera indica*. 5. *Annona crassiflora*. I. Santos, Orlando David Henrique dos. II. Universidade Federal de Ouro Preto. III. Título.

CDU 687.55

Bibliotecário(a) Responsável: Soraya Fernanda Ferreira e Souza - SIAPE: 1.763.787



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL DE OURO PRETO
REITORIA
ESCOLA DE FARMACIA
DEPARTAMENTO DE FARMACIA



FOLHA DE APROVAÇÃO

Larissa Silva Sampaio

Avaliação da Microbiota Facial Humana e Propriedades Prebióticas dos Extratos Vegetais da *Annona crassiflora* e *Mangifera indica* e Incorporação dos Extratos em Um Produto Cosmético

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal de Ouro Preto como requisito parcial para obtenção do título de mestre

Aprovada em 24 de novembro de 2022

Membros da banca

Prof. Dr. Orlando David Henrique dos Santos - Orientador - Universidade Federal de Ouro Preto
Prof. Dr. Breno de Mello Silva - Universidade Federal de Ouro Preto
Prof. Dr. Evandro Watanabe - Universidade de São Paulo

Prof. Dr. Orlando David Henrique dos Santos, orientador do trabalho, aprovou a versão final e autorizou seu depósito no Repositório Institucional da UFOP em 20/12/2022



Documento assinado eletronicamente por **Orlando David Henrique dos Santos, PROFESSOR DE MAGISTERIO SUPERIOR**, em 20/12/2022, às 14:56, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site http://sei.ufop.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0, informando o código verificador **0448532** e o código CRC **03A9ABEA**.

AGRADECIMENTOS

Agradeço à Deus e à espiritualidade, que foram minha âncora para que eu conseguisse realizar todo o trabalho.

À minha mãe, Elza Maria as Silva Sampaio, e meu pai, José Luiz Gomes Sampaio, minha eterna gratidão. Gratidão pela vida, pela base, pela estrutura, incentivo, apoio e amor.

Gratidão também aos meus irmãos, Luiz Henrique Silva Sampaio e Jéssica Silva Sampaio, que nunca me deixaram desamparada e sozinha. À Jéssica um agradecimento especial, por ser minha companheira de vida, de jornada, de laboratório e minha melhor amiga.

Agradeço aos meus professores e mentores Orlando David Henrique dos Santos, Luís Fernando Medeiros Teixeira e Gustavo Henrique Bianco de Souza, sem a orientação, ensinamento e apoio de vocês eu não teria realizado o projeto de pesquisa e, principalmente, não teria me desenvolvido tanto profissional e pessoalmente.

Muito obrigada à equipe do Laboratório de Fitotecnologia, onde eu aprendi, ajudei e fui ajudada, me diverti, fiz alianças e amizades que vou levar comigo.

Aos amigos que me acompanharam nesse momento, deixo aqui meu grande carinho, vocês foram pontos de leveza para mim.

E, por fim, agradeço aos órgãos de fomento CAPES, CNPq, FAPEMIG, às instituições UFOP, EFAR e NUPEB e aos laboratórios parceiros Laboratório Multiusuário de Proteômica e Biomolécula/ICEB e Laboratório de Bromatologia/ENUT.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 <i>Annona crassiflora</i>	22
Figura 2 Árvore de <i>Mangifera indica</i>	24
Figura 3 Análise granulométrica da folha seca e pulverizada de <i>M. indica</i>	40
Figura 4 Equação química da reação entre o composto fenólico e o reagente de Folin-Ciocalteu.....	41
Figura 5 Equação química da reação de complexação entre flavonoide e o reagente complexante, cloreto de alumínio ($AlCl_3$)	42
Figura 6 Reação de catequina com vanilina no método vanilina/HCl para determinação de taninos totais	43
Figura 7 Triagem da atividade antimicrobiana do extrato das folhas de <i>M. indica</i> em concentrações de 100 mg/mL, 50 mg/mL e 25 mg/mL.....	50
Figura 8 Triagem da atividade antimicrobiana do extrato das folhas de <i>A. crassiflora</i> em concentrações de 200 mg/mL, 100 mg/mL e 50 mg/mL.....	52
Figura 9 Colônias de microrganismos corada pela técnica de Gram.....	58
Figura 10 Placa com AMH e cultivo da amostra com co-cultura.....	58
Figura 11 Gráficos representando a curva de viabilidade celular conforme a concentração em mg/mL para os EEBs nos tempos de 24, 48 e 72 horas.....	60
Figura 12 Amostras de formulação branca e com associação dos EEB antes e após a centrifugação	61
Figura 13 Avaliação reológica da emulsão.....	62

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 Componentes da formulação da base cosmética	30
Tabela 2 Caracterização da folha de <i>M. indica</i> seca e pulverizada	38
Tabela 3 Quantidade de material vegetal retido em cada malha de tamis de diferentes tamanhos	39
Tabela 4: Equivalência de fenólicos totais ao ácido gálico no EEB de <i>Mangifera indica</i>	44
Tabela 5: Equivalência de flavonoides totais ao padrão Rutina no EEB de <i>Mangifera indica</i>	45
Tabela 6 Equivalência de fenólicos totais ao ácido gálico no EEB de <i>Annona crassiflora</i>	46
Tabela 7: Resultado da atividade antimicrobiana, em mm do diâmetro do halo de inibição, dos EEBs de <i>Mangifera indica</i> e <i>Annona crassiflora</i> em suas respectivas concentrações	49
Tabela 8: Avaliação quantitativa da atividade microbiológica dos EEBs de <i>Annona crassiflora</i> e <i>Mangifera indica</i> em colônias de <i>Staphylococcus aureus</i>	54
Tabela 9: Avaliação quantitativa da atividade microbiológica dos EEBs de <i>Annona crassiflora</i> e <i>Mangifera indica</i> em colônias de <i>Staphylococcus epidermides</i>	54
Tabela 10: Avaliação quantitativa da atividade microbiológica dos EEBs de <i>Annona crassiflora</i> e <i>Mangifera indica</i> em colônias de <i>Escherichia coli</i>	55
Tabela 11: Avaliação quantitativa da atividade microbiológica dos EEBs de <i>Annona crassiflora</i> e <i>Mangifera indica</i> em colônias de <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	56
Tabela 12 Avaliação quantitativa da atividade microbiológica da associação dos EEBs de <i>Annona crassiflora</i> e <i>Mangifera indica</i> em amostra contendo <i>E. coli</i> , <i>P. aeruginosa</i> , <i>S. aureus</i> e <i>S. epidermides</i>	56
Tabela 13 Avaliação quantitativa da atividade prebiótica da associação dos EEBs de <i>Annona crassiflora</i> e <i>Mangifera indica</i> em amostra contendo <i>E. coli</i> , <i>P. aeruginosa</i> , <i>S. aureus</i> e <i>S. epidermides</i>	57

LISTA DE ABREVIACOES

AMH	gar Mueller Hinton
CBM	Concentração bactericida mínima
CE	Equivalente de Catequina
CIM	Concentração inibitória mínima
CLAE	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
CLSI	Clinical and Laboratory Standards Institute
DMSO	Dimetilsulfóxido
DP	Desvio Padrão
EAG	Equivalente de ácido gálico
EEB	Extrato etanólico bruto
ER	Equivalente de rutina
FOS	Frutooligosacardeos
GOS	Galactooligosacardeos
MH	Mueller Hinton
O/A	leo em gua
OMG	Organização Mundial de Gastroenterologia
UFC	Unidade formadora de colnia
SRB	Sulforodamina B

RESUMO

A microbiota da pele humana é composta por uma grande variedade de microrganismos que atuam de forma simbiótica e trazem benefícios para o ser humano, quando em equilíbrio, contribuindo inclusive para a imunidade local. Esta é única em cada indivíduo, podendo ser influenciada pela idade, tipo de pele, local do corpo em que se encontra, local de residência, hidratação, pH da pele, sexo, entre outros. É evidente a crescente preocupação das pessoas acerca dos cuidados com a pele e também com o uso de produtos cosméticos que apresentam grandes quantidades de conservantes e tensoativos, que podem prejudicar esta microbiota. Com o objetivo de amenizar estes danos, surgiram os produtos com apelo prebiótico. Desta forma, o objetivo do trabalho foi avaliar o extrato etanólico bruto extraído do fruto maduro da *Annona crassiflora* e das folhas da *Mangifera indica* em uma formulação tópica, direcionado para aplicação na pele da face, através de uma avaliação fitoquímica onde foram quantificados compostos fenólicos, flavonoides e taninos totais; microbiológica qualitativa, CIM e CBM e avaliação da propriedade prebiótica; citotoxicidade em fibroblastos murinos (L929) e avaliação da estabilidade da formulação. Foi possível observar alterações relacionadas aos extratos na população bacteriana avaliada e desenvolver o cosmético para a pele da face.

Palavras-chave: Microbiota, cosmético prebiótico, *Mangifera indica*, *Annona crassiflora*

ABSTRACT

The human skin microbiota is composed of a wide variety of microorganisms acting in a symbiotic way and bring benefits to human being, when in its balance, even contributing to local immunity. It is unique in each individual, and can be influenced by age, skin type, body location, place of residence, hydration, skin pH, sex, among others. It is evident people's growing concern about skin care and also with the use of cosmetic products that have large amounts of preservatives and surfactants, which can harm the microbiota. With the objective of mitigating these damages, products with prebiotic appeal appeared. In this way, the objective of this work was to evaluate the crude ethanol extract extracted from the ripe fruit of *Annona crassiflora* and the leaves of *Mangifera indica* in a topical formulation, intended for application on the skin of the face, through a phytochemical evaluation where total phenolic compounds, total flavonoids and total tannins; qualitative microbiology, MIC and MBC and evaluation of prebiotic property; cytotoxicity in murine fibroblasts (L929) and evaluation of formulation stability. It was possible to observe changes related to the extracts in the bacterial population evaluated and to develop the cosmetic for the skin of the face.

Keywords: Microbiota, prebiotic cosmetic, *Mangifera indica*, *Annona crassiflora*

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	12
2 OBJETIVOS	15
2.1 Objetivo geral	15
2.2 Objetivos específicos	15
3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	16
3.1 A microbiota humana	16
3.1.1 Microbiota intestinal.....	16
3.1.2 Microbiota da pele.....	17
3.1.3 Eixo intestino-pele.....	19
3.2 Substâncias prebióticas e probióticas	19
3.3 Influência dos cosméticos na microbiota cutânea	21
3.4 <i>Annona crassiflora</i>, oligossacarídeos e suas propriedades prebióticas	21
3.5 <i>Mangifera indica</i>, polifenóis e suas propriedades prebióticas	23
4 MATERIAL E MÉTODOS	25
4.1. Coleta do material	25
4.2 Identificação por exsicata	25
4.3 Secagem da folha de <i>Mangifera indica</i>	25
4.4 Obtenção da polpa do fruto de <i>Annona crassiflora</i>	25
4.5 Caracterização do material vegetal.....	25
4.6 Obtenção do extrato de <i>Mangifera indica</i>	26
4.7 Obtenção do extrato de <i>Annona crassiflora</i>	27
4.8 Teste de identificação de fenólicos totais nos extratos brutos de <i>Mangifera indica</i> e <i>Annona crassiflora</i>	27

4.9	Teste de quantificação de Flavonóides totais nos extratos brutos de <i>Mangifera indica</i> e <i>Annona crassiflora</i>	28
4.10	Teste de avaliação de Taninos nos extratos brutos de <i>Mangifera indica</i> e <i>Annona crassiflora</i>	29
4.11	Formulação cosmética e incorporação do extrato de <i>M. indica</i> e <i>A. crassiflora</i>	30
4.12	Testes microbiológicos.....	31
4.13	Citotoxicidade	35
4.14	Avaliação da formulação.....	36
5.	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	38
5.1	Caracterização do material vegetal	38
5.2	Rendimento do extrato bruto de <i>Mangifera indica</i>	40
5.3	Rendimento do extrato bruto de <i>Annona crassiflora</i>	40
5.4	Avaliação fitoquímica	41
5.4.1	Teste de identificação de fenólicos totais no extrato bruto de <i>Mangifera indica</i>	43
5.4.2	Teste de identificação de Flavonoides totais no extrato bruto de <i>Mangifera indica</i>	44
5.4.3	Teste de identificação de compostos fenólicos totais e flavonóides totais no extrato bruto de <i>Annona crassiflora</i>	45
5.4.4	Teste de identificação de Taninos nos extratos brutos de <i>Mangifera indica</i> e <i>Annona crassiflora</i>	46
5.5	Testes microbiológicos	47
5.5.1	Cultura de microrganismos	47
5.5.2	Triagem da atividade antimicrobiana dos extratos brutos de <i>Mangifera indica</i> e <i>Annona crassiflora</i>	48

5.5.3 Avaliação quantitativa da atividade microbiológica dos extratos brutos de <i>Mangifera indica</i> , <i>Annona crassiflora</i> e associação dos extratos.....	53
5.5.4 Avaliação da atividade prebiótica da associação dos extratos brutos de <i>Mangifera indica</i> e <i>Annona crassiflora</i>	57
5.6 Citotoxicidade em fibroblastos L929	59
5.7 Avaliação da formulação	60
5.7.1 Teste de centrifugação	60
5.7.2 Avaliação do comportamento reológico.....	61
6. CONCLUSÃO	63
PERSPECTIVAS.....	64
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	65

1 INTRODUÇÃO

A pele é o maior e mais exposto órgão do corpo e seu sistema microbiológico é facilmente influenciado por fatores internos e externos. Em indivíduos de microbiota saudável, há um balanço entre os microrganismos patogênicos e não patogênicos, diferente de um quadro de disbiose onde o desequilíbrio pode levar ao aumento ou presença das doenças de pele (CATINEAN *et al.*, 2019).

A microbiota da pele é uma camada de microrganismos biologicamente ativos localizada acima do estrato córneo, possui importância tanto na saúde da pele quanto na saúde do indivíduo no geral, atuando como a primeira barreira contra agentes externos, seja patógenos ou toxinas (LEHTIMÄKI *et al.*, 2017; PRESCOTT *et al.*, 2017). É capaz de modular a imunidade local à medida que estes microrganismos interagem entre si e com o hospedeiro, mantendo a integridade da pele (CHEN *et al.*, 2018; LEHTIMÄKI *et al.*, 2017; PRESCOTT *et al.*, 2017).

Ao longo de todo o tecido cutâneo há variações em quantidades de folículo piloso, glândulas sebáceas e oleosidade, criando microambientes diferentes na pele (CHEN *et al.*, 2018). Também, algumas particularidades individuais como umidade da pele, temperatura e pH (SCHOMMER; GALLO, 2013) tornam a microbiota da pele individual em cada pessoa, se apresentando de forma heterogênea e podendo se alterar de acordo com a área do corpo analisada (PRESCOTT *et al.*, 2017).

A interação microrganismo-microrganismo ocorre de forma comensal e mutualística sendo mais prevalentes as bactérias dos filos *Firmicutes*, *Bacteroidetes*, *Proteobacteria* e *Actinobacteria* (GRICE *et al.*, 2008). Pertencentes a estes filos, as bactérias mais prevalentes são dos gêneros *Staphylococcus*, *Propionibacterium*, *Corynebacterium* (BYRD; BELKAID; SEGRE, 2018) e *Pseudomonas* (GRICE *et al.*, 2008). Assim, a presença de bactérias como *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Propionibacterium acne*, *Corynebacterium striatum* e *Pseudomonas aeruginosa* influenciam ativamente no equilíbrio da microbiota cutânea, influenciando no comensalismo e no aparecimento de patologias (CHEN *et al.*, 2018; PRESCOTT *et al.*, 2017).

Algumas espécies presentes na microbiota cutânea são patogênicas e contribuem, para o aparecimento e/ou desenvolvimento de dermatite atópica (NAKATSUJI *et al.*, 2017; YAMAZAKI; NAKAMURA; NÚÑEZ, 2017), acne (DAGNELIE *et al.*, 2019; MURILLO; RAOULT, 2013; ROCHA; BAGATIN, 2018) e infecção dérmica (GARCIA *et al.*, 2018; PFALZGRAFF; BRANDENBURG; WEINDL, 2018; WU *et al.*, 2011).

Staphylococcus epidermidis é comensal residente e, quando em equilíbrio, é capaz de eliminar bactérias patogênicas do sítio em que atua, porém pode ser patogênica oportunista causando também infecções dérmicas (BRESÓ *et al.*, 2017).

O gênero *Corynebacterium* possui tanto bactérias residentes e benéficas quanto bactérias patogênicas, entretanto a espécie citada possui papel importante no comensalismo, sendo considerada benéfica (ERIN CHEN; FISCHBACH; BELKAID, 2018).

Fatores internos como oleosidade e idade influenciam diretamente a dinâmica dessa população (LEHTIMÄKI *et al.*, 2017), mas ainda existem importantes interferentes externos como todo o meio ambiente onde vive, clima, ocupação e higiene do indivíduo (CALLEWAERT; RAVARD HELFFER; LEBARON, 2020; CATINEAN *et al.*, 2019).

Os produtos de higiene hoje em dia são de extrema importância para a sociedade e podem influenciar na microbiota da pele de forma mecânica ou química, através da ação de algum composto presente, interferindo no equilíbrio e comensalismo de todo o ecossistema ali presente (SFRISO; CLAYPOOL, 2020).

Desta forma se faz necessário o uso de substâncias que retornem a microbiota cutânea ao seu equilíbrio e homeostasia, reestabelecendo o comensalismo e interações microrganismos-hospedeiro benéficas, preferencialmente o uso de substância natural, que vem se valorizando dentro do mercado global de valor para cosméticos naturais, mostrando a importância da pesquisa de ativos naturais e sua introdução no mercado (BERI, 2018).

O uso de substâncias prebióticas estimula seletivamente a proliferação de bactérias benéficas, contribuindo para a regulação da microbiota da pele, sendo usada tanto para prevenção quanto para tratamento de doenças dérmicas (LOLOU; PANAYIOTIDIS, 2019). Assim, neste trabalho foram avaliados polifenóis e oligossacarídeos com potencial prebiótico para a microbiota da pele, visto que há estudos na literatura relatando o uso de ambas as substâncias com este objetivo (MARKOWIA & ŚLIŻEWSKA, 2017; COMAN *et al.*, 2017)

Este projeto se justifica com a necessidade do mercado em lançar cosméticos com um novo conceito e apelo às propriedades prebióticas, e ainda, aliando esta necessidade à tendência mundial de uso dos produtos naturais devido à preocupação com potenciais agentes que possam ser absorvidos pela pele sem causar danos à saúde e ao meio ambiente quando enxaguados.

Os polifenóis são metabólitos secundários presentes em algumas plantas e extensamente usados em cosméticos, com propriedade antioxidante, anti-idade e antimicrobiana (KORKINA; DE LUCA; PASTORE, 2012; RATZ-YKO *et al.*, 2015) e os

oligossacarídeos são carboidratos de baixo peso molecular (PATEL; GOYAL, 2011) com propriedades prebióticas benéficas para a microbiota da pele (HONG *et al.*, 2020).

O uso do fruto maduro de *Annona crassiflora* se justifica por ser tipicamente brasileiro e possuir oligossacarídeo em sua composição (ARRUDA, HENRIQUE SILVANO; PASTORE, 2019), substância já citada com potencial propriedade prebiótica (HONG *et al.*, 2020) e o uso da folha de *Mangifera indica* se justifica por ser uma espécie abundante no Brasil e possuir polifenóis em sua composição (SEVERI *et al.*, 2009) com propriedade anti-inflamatória e antimicrobiana (KORKINA; DE LUCA; PASTORE, 2012; RATZ-YKO *et al.*, 2015).

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Avaliar o potencial prebiótico dos extratos do fruto maduro de *Annona crassiflora* e das folhas de *Mangifera indica* quando incorporados em um produto cosmético direcionado para a microbiota da face.

2.2 Objetivos específicos

- A.** Realizar a caracterização fitoquímica dos extratos do fruto maduro de *Annona crassiflora* e das folhas da *Mangifera indica*.
- B.** Avaliar a capacidade de modulação da carga microbiana dos extratos do fruto maduro de *Annona crassiflora* e das folhas da *Mangifera indica*.
- C.** Desenvolver uma formulação de produto cosmético com a incorporação dos extratos de *Annona crassiflora* e *Mangifera indica*.

3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 A microbiota humana

Os seres humanos vivem em simbiose e comensalismo com diversas espécies de microrganismos e estes colonizam diferentes partes do corpo como a cavidade oral, a pele, o trato gastrointestinal, a vagina, dentre outros. Este conjunto de microrganismos forma a microbiota humana (SCHWIERTZ; RUSCH, 2016).

Na microbiota podem ser encontrados vírus, protozoários, fungos, artrópodes e, em sua maioria, as bactérias, que se organizam em nichos de acordo com sítios mais adequados para sua sobrevivência, levando em consideração o pH, temperatura, oleosidade, entre outros fatores (GRICE et al., 2008; SCHWIERTZ; RUSCH, 2016).

Os microrganismos, quando em simbiose ou comensalismo, desempenham diferentes funções no organismo humano como auxílio nutricional, metabolismo de moléculas, combate de patógenos e modulação do sistema imune e, quando em desequilíbrio, podem facilmente desencadear doenças (CONG; ZHANG, 2018).

Neste trabalho serão colocadas em evidência a microbiota intestinal e a microbiota da pele, devido à relação direta entre eles e com os objetivos do projeto. Estes assuntos serão abordados nas seções posteriores.

3.1.1 Microbiota intestinal

O desenvolvimento da microbiota intestinal tem início no momento do nascimento e completa seu desenvolvimento por volta dos três anos de idade, impactando na saúde e homeostase do indivíduo através de mecanismos como metabolismo de nutrientes e fármacos, defesa contra patógenos, produção de suprimentos para células epiteliais, entre outros, podendo ser alterada por fatores ambientais, pela dieta, uso de medicamentos e a região em que se encontra (TRINH et al., 2018; HARMSSEN; GOFFAU, 2016; WILSON et al., 2020).

As diferentes regiões do intestino apresentam diferentes comunidades de microrganismos, alterando, além da localidade, sua variedade e densidade. Por sofrer maior influência da dieta do indivíduo ao longo do dia, a microbiota presente no intestino delgado sofre maiores variações do que a microbiota do intestino grosso, influenciando assim na sua interação com o hospedeiro (AIDY; VAN DEN BOGERT; KLEEREBEZEM, 2015).

A diversificada microbiota intestinal não somente produz nutrientes e vitaminas que são aproveitados pelos indivíduos, como também interagem com eles diretamente através de

seu estado nutricional, metabólico e de saúde, levando à doenças como obesidade, câncer colorretal, artrite reumatoide, dermatites e outras (CONG; ZHANG, 2018; MISCHKE; PLOSCH, 2016).

Sua diversidade se apresenta nas 400 a 1500 espécies diferentes, presentes principalmente no cólon, sendo algumas ainda não identificadas pelo ser humano. Em maior proporção, no intestino de adulto saudável é possível encontrar bactérias pertencentes aos filos Bacteroidetes e Firmicutes, seguidos pelas bactérias pertencentes aos filos Actinobacteria e Proteobacteria (HARMSSEN; GOFFAU, 2016).

A composição da microbiota não é estável ao longo da vida de um indivíduo, ela pode sofrer variações de acordo com a idade, estado de saúde, dieta, entre outros fatores. Uma grande variação na população microbiana, em qualidade ou quantidade, leva à um desequilíbrio no relacionamento microrganismos-hospedeiro, conhecido como disbiose, sendo possível evoluir para diferentes doenças e influenciar outras microbiotas, principalmente a microbiota cutânea (DUDA-CHODAK et al., 2015).

Uma microbiota intestinal saudável e funcional contribui para que o hospedeiro mantenha sua homeostase, assim influenciando o funcionamento de todo o organismo, inclusive das demais microbiotas como a oral e cutânea (TRINH et al., 2018). As microbiotas intestinal e cutânea possuem ligação e interferência direta devido à sua participação no mecanismo do eixo intestino-pele, assuntos que serão abordados nas seções seguintes.

3.1.2 Microbiota da pele

Os microrganismos estão presentes nas camadas mais profundas da pele e, assim como a microbiota intestinal, tem seu início no momento do nascimento, formando uma microbiota única e diferente em cada indivíduo que, em sua maioria, são comensais e benéficas para o hospedeiro (BERI, 2018; LEHTIMÄKI *et al.*, 2017; MAGUIRE; MAGUIRE, 2017).

Os filos mais presentes em uma microbiota cutânea saudável são os Actinobacteria, Proteobacteria, Firmicutes e Bacteroidetes e os gêneros identificados são *Corynebacterium*, *Propionibacterium* e *Staphylococcus*, apesar de esta camada ser bastante heterogênea entre as regiões do corpo e entre os indivíduos. Sua composição pode se alterar de acordo com o sexo, idade, área do corpo, etnia, ambiente externo como clima e poluição e interno como estresse, dieta e higiene (CALLEJON *et al.*, 2020; SCHOMMER; GALLO, 2013).

Regiões como a face possuem alta densidade de glândulas sebáceas e promovem o crescimento de microrganismos lipofílicos como *Propionibacterium* e *Malassezia*. E, de

forma diferente, em regiões menos expostas como as axilas e entre os dedos do pé, onde há maior temperatura e componentes oleosos, é mais colonizado por *Staphylococcus* e *Corynebacterium* (BOUSLIMANI *et al.*, 2015).

As bactérias do gênero *Corynebacterium* estão presentes em todos os sítios do corpo e são um dos gêneros responsáveis pelo comensalismo. Ainda que menos prevalentes, os vírus, fungos e parasitas também fazem parte da microbiota cutânea (CHEN *et al.*, 2018; GRICE *et al.*, 2008; PRESCOTT *et al.*, 2017).

Na pele, a camada de microrganismos faz a interface entre o órgão e o meio externo servindo como barreira física e contribuindo para a proteção do indivíduo. Por representar a primeira linha de defesa da pele, a ocorrência de uma disbiose pode resultar em infecções ou doenças e, quando em seu estado fisiológico, é estabelecida uma harmonia entre os microrganismos que compõem a microbiota e a comunicação com as células imunes de seu hospedeiro (BERI, 2018; CALLEJON *et al.*, 2020).

De acordo com Rebecca e colaboradores (2020) uma microbiota de pele equilibrada e com funções fisiológicas adequadas gera um ambiente protetor que limita a capacidade das bactérias patogênicas de iniciar e propagar uma infecção oportunista, porém a introdução de bactérias patogênicas como *Staphylococcus aureus* e *Pseudomonas aeruginosa* pode resultar em um balanço negativo e dar início a um processo infeccioso e inflamatório (KNACKSTEDT; KNACKSTEDT; GATHERWRIGHT, 2020b).

Catinean e colaboradores (2019) trazem a associação de doenças de pele imunomediadas com a microbiota da pele, pelo fato de os microrganismos residentes da pele serem capazes de modular a homeostase do sistema imune local e, portanto, são potencialmente parte do mecanismo por trás das doenças autoimunes da pele.

Uma das doenças dérmicas imunomediadas mais comuns é a dermatite atópica, que envolve em sua fisiopatologia tanto a alteração da barreira epitelial quanto uma resposta imune anormal. Acne, psoríase e hidradenite supurativa são outros exemplos de doenças que tem como uma de suas causas o desequilíbrio da microbiota (BALATO *et al.*, 2019; CATINEAN *et al.*, 2019).

Espécies de *Corynebacterium* normalmente não causam patologias conhecidas, com exceção das espécies *Corynebacterium minutissimum* e *Corynebacterium tenuis* que são conhecidas por causarem patologias superficiais da pele (CHEN *et al.*, 2018).

Espécies de microrganismos dos gêneros *Staphylococcus*, *Corynebacterium* e *Propionibacterium* fazem parte da flora bacteriana normal da pele, porém algumas espécies

como *Staphylococcus aureus* ou *Pseudomonas aeruginosa* são patogênicas e, uma vez instaladas na derme podem provocar um balanço negativo desta microbiota e levar a uma infecção (KNACKSTEDT et al, 2020).

3.1.3 Eixo intestino-pele

O intestino e a pele são dois órgãos que fazem a interface primária entre os meios externo e interno e possuem ligação direta entre si a partir da influência que a microbiota intestinal exerce na microbiota cutânea, contribuindo para a regulação da alelostase da pele, mecanismo pelo qual acontece a regulação da homeostase, e regulando a microbiota cutânea após um período de disbiose ou impactando negativamente a homeostase da pele e refletindo em uma disbiose cutânea (SALEM et al., 2018).

A composição desta camada de microrganismos pode ser alterada pelo sistema imunológico inato e adaptativo e, inversamente, a microbiota local pode modular o sistema imunológico do hospedeiro. A imunidade inata possui a capacidade de diferenciar as bactérias comensais das bactérias patogênicas, assim a imunidade adaptativa não é ativada para os microrganismos residentes (PESSEMIER *et al.*, 2021; SINHA; LIN; FERENCZI, 2021).

O mecanismo exato de como a microbiota intestinal e cutânea interferem no sistema imune, entre si, ainda não foi totalmente esclarecido, apesar de muitos estudos mostrarem a influência da disbiose intestinal no desequilíbrio da homeostase da pele (PESSEMIER *et al.*, 2021).

Levando em consideração a dinâmica entre as microbiotas intestinal e cutânea e o sistema imunológico do hospedeiro pode-se entender a função das substâncias prebióticas e probióticas em sua manutenção e reequilíbrio, que serão abordados na seção posterior.

3.2 Substâncias prebióticas e probióticas

A partir do conhecimento da microbiota humana e de sua importância e influência no organismo como um todo, faz-se necessário o estudo de alternativas de modulação, manutenção e reequilíbrio da camada de microrganismos.

De acordo com a Organização Mundial de Gastroenterologia (OMG) probióticos são microrganismos vivos que, quando administrados em quantidades adequadas, conferem benefícios à saúde do hospedeiro e os prebióticos são ingredientes seletivamente fermentados que permitem mudanças específicas na composição e/ou atividade da microbiota gastrointestinal, conferindo assim benefícios à saúde do hospedeiro (GUARNER *et al.*, 2017).

Prebióticos são ingredientes ou substâncias que promovem o crescimento de certas bactérias. Para uma substância ser considerada prebiótica são necessários três características: primeiro ela precisa ser resistente às enzimas dos mamíferos, e se falamos em prebióticos intestinais também é necessário ser resistente à absorção intestinal, segundo é necessário que a substância seja fermentada pela microbiota e, por fim, é importante que a substância estimule seletivamente a atividade fisiológica e o crescimento das bactérias (NOTAY *et al.*, 2017).

A microbiota humana, seja do intestino ou da pele, é uma camada que possui um dinamismo particular, podendo ser alterada de acordo com o tempo e com o ambiente em que está. Além de acontecer uma dinâmica natural da microbiota, podem também acontecer alterações artificiais, como, por exemplo, tratamentos ou cosméticos que causam alterações nesta camada (WALKER, 2016).

Algumas alterações artificiais podem ocorrer com o objetivo de manipular a camada de microrganismos da pele, com o intuito de selecionar e aumentar a quantidade de bactérias benéficas. Para cumprir com esse intuito podem ser usados nutrientes específicos, os prebióticos, ou microrganismos vivos, os probióticos (EGERT, M., SIMMERING, R., 2016).

Cosméticos com o conceito prebiótico foram desenvolvidos nos últimos anos e podem ser uma forma de alcançar e preservar o equilíbrio da microbiota da pele. Foram observados extratos de plantas que tiveram efeito inibitório em *Propionibacterium acne* e efeitos estimuladores em *Staphylococcus epidermidis* (EGERT, M., SIMMERING, R., 2016).

A escolha correta dos prebióticos é importante para que sejam estimuladas apenas as bactérias comensais da pele e do intestino, e não as patogênicas, e assim melhorar a saúde do hospedeiro como um todo (MAGUIRE; MAGUIRE, 2017).

Prebióticos como os galactooligosacarídeos (GOS) e os polifenóis são considerados nutriente para as bactérias benéficas e é definido como um composto que afeta positivamente o hospedeiro, estimulando o crescimento de bactérias benéficas e limitando o crescimento de bactérias patogênicas (DUDA-CHODAK *et al.*, 2015; MAGUIRE; MAGUIRE, 2017).

Assim, como foco na microbiota da pele, serão abordados nas próximas seções a influência dos cosméticos nesta camada de microrganismos e substâncias com potencial prebiótico para sua manutenção e equilíbrio.

3.3 Influência dos cosméticos na microbiota cutânea

A composição da microbiota da pele humana é formada por microrganismos residentes e transitórios e sua composição varia de acordo com a área em que está localizada, se o ambiente é oleoso, misto ou seco e também pode ser influenciada pelos produtos de higiene e beleza (BOUSLIMANI *et al.*, 2015; LEOTY-OKOMBI *et al.*, 2021).

Os seres humanos usam cosméticos para a higiene como sabonetes, géis de limpeza, fragrâncias e outros, que podem alterar a microbiota da pele de forma química, a partir de produtos que contenham conservantes e ingredientes sintéticos em sua formulação e são capazes de alterar o pH da pele ou de forma mecânica, removendo os microrganismos no momento do enxague ou aplicação (MAGUIRE; MAGUIRE, 2017; SFRISO; CLAYPOOL, 2020).

Ao criar uma nova formulação cosmética é necessário levar em consideração a microbiota cutânea e criar um microambiente mais próximo do natural possível, mantendo a simbiose e comensalismo dos microrganismos existentes no local (BERI, 2018).

Há evidências de que dietas baseadas em plantas beneficiam a microbiota do intestino, assim, devido ao eixo intestino-pele, pode-se levar em consideração que cosméticos tópicos a base de plantas também são uma fonte saudável de nutrientes para a microbiota da pele (BERI, 2018).

3.4 *Annona crassiflora*, oligossacarídeos e suas propriedades prebióticas

Araticum, o fruto da espécie *Annona crassiflora* (Figura 1), também conhecido como marolo, ariticum, pinha do cerrado, entre outros, é uma fruta exótica do cerrado brasileiro encontrada em alguns estados brasileiros como Minas Gerais, Bahia e São Paulo, rica em açúcares, fibras e compostos nutricionais (ARRUDA, HENRIQUE SILVANO; PASTORE, 2019; ARRUDA, HENRIQUE SILVANO; PEREIRA; PASTORE, 2017).

A polpa madura do araticum, além de ser fonte de fibras e compostos nutricionais, é também fonte de vitamina A e C, compostos antioxidantes e possui alto teor de carboidratos, dentre eles, os oligossacarídeos (ARRUDA, HENRIQUE SILVANO; PASTORE, 2019; DA SILVA, EDSON PABLO; VILAS BOAS; XISTO, 2013).

Os oligossacarídeos são polímeros de três a dez resíduos de monossacarídeos que demonstram atividade prebiótica e podem ser encontrados na forma livre ou ligada e podem também ser produzidos a partir de meios físicos, processos químicos ou enzimáticos ou ainda

serem obtidos de fontes naturais como o araticum, a banana e a jaca (CEZAR *et al.*, 2018; THAMMARUTWASIK *et al.*, 2009).

Os polímeros de carboidrato possuem função de adoçar os alimentos e conferir características sensoriais. Podendo ser classificados como digeríveis ou não-digeríveis, eles possuem funções fisiológicas na saúde humana, como um comportamento prebiótico, onde são fermentados pela microbiota, estimulando seletivamente o crescimento e atividades funcionais da mesma, alterando seu balanço para uma composição mais saudável (ARRUDA, HENRIQUE SILVANO; PEREIRA; PASTORE, 2017; CEZAR *et al.*, 2018).



Figura 1 *Annona crassiflora*

Legenda: *Annona crassiflora*. A) Árvore; B) Tronco; C) Tronco e galhos; D) Folhas; E) Botões florais; F) Flor; G) Flor com pétalas; H) Fruto verde; I) Fruto maduro; J) Fruto seccionado; K) Gomos; L) Sementes.

Fonte: Arruda, 2019

3.5 *Mangifera indica*, polifenóis e suas propriedades prebióticas

A *Mangifera indica* (Figura 2), popularmente conhecida como manga e usada pela medicina indígena há mais de 4000 anos, pertence à família Anacardiaceae, e tem sua origem no Sul da Ásia, se tornando comum em diferentes partes do mundo (DERESE *et al.*, 2017).

Os estudos fitoquímicos desta planta indicam a presença de compostos bioativos altamente efetivos com funções bactericidas, antifúngicas, antioxidante, antidiabética e antiviral e dentre seus constituintes químicos estão presentes os compostos alifáticos, terpenóides, flavonóides, alcaloides, cumarinas, saponinas, taninos, óleos essenciais e os polifenóis, sendo esta a substância de maior interesse deste trabalho (DERESE *et al.*, 2017; PAN *et al.*, 2018).

Os polifenóis apresentam propriedades prebióticas podendo induzir mudanças na organização e funções fisiológicas do ecossistema microbiano, desempenhando um estímulo da atividade metabólica dos microrganismos, melhorando a viabilidade *in vitro* e *in vivo* de microrganismos, assim melhorando também a disbiose intestinal e parâmetros de saúde (COMAN *et al.*, 2018; MOORTHY; SUNDRALINGAM; PALANISAMY, 2021; RODRÍGUEZ-DAZA *et al.*, 2021).

No intestino, apenas uma pequena porcentagem dos polifenóis são absorvidos, e a porcentagem não absorvida se acumula no intestino grosso onde estes compostos são metabolizados pelas bactérias locais e transformados em metabólitos fenólicos simples, alterando o microbioma a favor da colonização de microrganismos benéficos para o organismo humano, fatores que evidenciam a propriedade prebiótica dos polifenóis (MOORTHY *et al.*, 2020; THILAKARATHNA; LANGILLE; RUPASINGHE, 2018).



Figura 2 Árvore de *Mangifera indica*

Fonte: Derese, 2017

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1. Coleta do material

Foram coletados frutos maduros de *Annona Crassiflora* no distrito de Itatiaiuçu – MG, localização geográfica Lat: -20° 11' 45'' S, Long: -44° 24' 58'' O e Alt: 882m, e folhas de *Mangifera indica*, também no distrito de Itatiaiuçu-MG, localização geográfica Lat: -20° 11' 50'' S, Long: -44° 25' 05'' O e Alt: 887m para preparação dos extratos, assim como foram coletados galhos com folhas, flores e frutos de ambas as espécies para confecção de exsicata. A utilização de ambas as espécies foi previamente cadastrada no Sistema de Gerenciamento do Patrimônio Genético Brasileiro - SISGEN, sob número de registro AC48977.

4.2 Identificação por exsicata

As exsicatas foram confeccionadas e armazenadas no Herbário Professor José Badini no Departamento de Biologia da Universidade Federal de Ouro Preto sob número de registro 35701 e 35703 para a espécie *M. indica* e 35702 e 35704 para a espécie *A. crassiflora*.

4.3 Secagem da folha de *Mangifera indica*

As folhas da espécie *M. indica* coletadas passaram por um processo de secagem em estufa a 40°C por um período de 10 horas, foram trituradas e pulverizadas em moinho de facas e utilizadas na produção do extrato (BARRETO *et al.*, 2008).

4.4 Obtenção da polpa do fruto de *Annona crassiflora*

A polpa de *Annona crassiflora* foi obtida de acordo com a metodologia aplicada por Arruda e colaboradores, 2017. A fruta madura foi lavada exteriormente com o objetivo de retirar sujidades e possíveis contaminantes, sua polpa foi manualmente separada das sementes e casca, posteriormente congelada a -20°C até o momento do preparo do extrato.

4.5 Caracterização do material vegetal

4.5.1 Avaliação do teor de umidade da folha seca de *M. indica*

Foi pesado o cadinho vazio e, posteriormente, 1g da folha de *M. indica* seca e pulverizada para a obtenção do peso inicial do cadinho. A amostra foi deixada em estufa por

15 min a 105°C e resfriada em dessecador. O teste foi realizado em triplicata e o teor de umidade foi obtido a partir da equação abaixo (Farmacopeia Brasileira, 2019).

$$\text{Teor de umidade \%} = \frac{\text{Peso inicial} - \text{Peso final}}{\text{Peso inicial}} \times 100$$

4.5.2 Avaliação do teor de cinzas da folha seca de *M. indica*

Foi pesado o cadinho vazio e adicionado 5g da folha de *M. indica* seca e pulverizada. A amostra foi levada à mufla para incineração e deixada a 250° C por 4h e, posteriormente, a 550°C por 6h até completa incineração. O teste foi realizado em triplicata e o teor de cinzas foi obtido através da equação abaixo (Farmacopeia Brasileira, 2019).

$$\text{Teor de cinzas \%} = \frac{\text{Resíduo do cadinho (g)}}{\text{Peso da amostra (g)}} \times 100$$

4.5.3 Análise granulométrica da folha seca de *M. indica*

Foram selecionados tamises de malhas 1,19 mm; 0,59 mm; 0,50 mm; 0,42 mm, 0,210 mm e 0,125 mm. Foram anotados os pesos de cada malha vazia e adicionado à primeira 25g de folha de *M. indica* seca e pulverizada. O processo de tamisação teve duração de 30 min e, posteriormente, foi anotado o peso de cada malha e determinado o perfil granulométrico da amostra (PIERRI *et al.*, 2017).

4.5.4 Análise de perda de umidade por dessecação da folha seca de *M. indica*

Foi pesado o cadinho vazio e, posteriormente, 1g da folha de *M. indica* seca e pulverizada para a obtenção do peso inicial do cadinho. A amostra foi deixada em estufa por 2h a 105°C e resfriada em dessecador. O teste foi realizado em triplicata e o teor de perda de umidade por dessecação foi obtido a partir da equação abaixo (PIERRI *et al.*, 2017).

$$\text{Perda por dessecação \%} = \frac{\text{Resíduo do cadinho (g)}}{\text{Peso da amostra (g)}} \times 100$$

4.6 Obtenção do extrato de *Mangifera indica*

Foi produzido o extrato etanólico pelo método de percolação a partir do solvente etanol 92,8° GL e 455g de folhas de *Mangifera indica* pulverizadas. O extrato obtido teve seu

volume reduzido em rotaevaporador e levado à secagem no dessecador até que atingiu peso constante. O cálculo do rendimento foi realizado a partir de uma regra de três onde a massa inicial de folhas secas representou 100% de toda a amostra.

4.7 Obtenção do extrato de *Annona crassiflora*

A polpa madura de *Annona crassiflora*, anteriormente armazenada a -20°C, passou pelo processo de liofilização no Laboratório Multiusuário de Proteômica e Biomoléculas, no equipamento de marca VisTis, modelo Benchtop K, à temperatura -105,5°C e pressão 999mBar.

A polpa liofilizada foi utilizada para o preparo do extrato de acordo com a metodologia apresentada por Jovanovic-Malinovska, 2015, com modificações. Para a realização do extrato foi utilizada a proporção 1:10 (um grama de amostra liofilizada para dez mL de solvente). Foram pesados 132,5 gramas da polpa liofilizada e adicionados 1325ml de etanol 92,8°GL, a mistura foi deixada no ultrassom de marca Unique, modelo USC-1600 e frequência 40Hz por 60 minutos à temperatura ambiente, sendo agitada mecanicamente com o auxílio de um pistilo a cada 20 minutos. Posteriormente foi realizado o processo de filtração simples e o extrato foi seco em rotaevaporador de marca Fisatom a 100 rpm e 40°C e posteriormente em estufa de marca Nova Instruments e modelo NI1512 até obtenção de peso constante. O cálculo do rendimento foi realizado a partir de uma regra de três onde a massa inicial da polpa de Araticum liofilizada representou 100% de toda a amostra (JOVANOVIC-MALINOVSKA; KUZMANOVA; WINKELHAUSEN, 2015).

4.8 Teste de identificação de fenólicos totais nos extratos brutos de *Mangifera indica* e *Annona crassiflora*

Para a quantificação de fenólicos totais nos extratos de *Mangifera indica* e *Annona crassiflora* foi aplicado o método do reagente de Folin-Ciocalteu segundo Bonoli e colaboradores, com modificações (BONOLI *et al.*, 2004), utilizando placas e leitor de microplacas para leitura da absorbância.

Foram preparadas, em metanol, as soluções estoques dos extratos de *Mangifera indica* e *Annona crassiflora* na concentração de 25 mg/mL e realizadas diluições seriadas de cada extrato nas concentrações de 5,0 mg/mL, 2,5 mg/mL e 1,25 mg/mL para *A. crassiflora* e 1,25 mg/mL e 0,75 mg/mL para *M. indica*, as quais foram utilizadas no experimento. Preparou-se também 5 mL de carbonato de sódio a 15% (p/v).

Em uma placa de 96 poços foi adicionado 30 µL de água destilada, 80 µL das soluções de amostras preparadas anteriormente, 10 µL do reagente de Folin-Ciocalteu e agitou-se por 1 minuto. Posteriormente foi adicionado 40 µL da solução de carbonato de sódio previamente preparada, agitou-se por mais 30 segundos e, por fim, foi adicionado 40 µL de água destilada.

Para o preparo do branco foram pipetados nos poços correspondentes 80 µL das soluções de amostra e 120 µL de água destilada.

Para a curva padrão do extrato de *M. indica* foi utilizado o padrão ácido gálico, preparado em metanol na concentração de 1,0 mg/mL e foram preparados dez pontos nas concentrações de 10 µL/mL, 25 µL/mL, 50 µL/mL, 75 µL/mL, 100 µL/mL, 150 µL/mL, 200 µL/mL, 250 µL/mL, 300 µL/mL, 350 µL/mL e, para a curva padrão do extrato de *A. crassiflora* foi utilizado o padrão ácido gálico, preparado em metanol na concentração de 0,2 mg/mL e foram preparados nove pontos nas concentrações de 5 µL/mL, 10 µL/mL, 20 µL/mL, 30 µL/mL, 60 µL/mL, 70 µL/mL, 80 µL/mL, 100 µL/mL e 110 µL/mL. O procedimento de preparo da curva padrão seguiu as mesmas instruções do procedimento de preparo das amostras.

As placas foram incubadas pelo prazo de 2 horas em ambiente protegido da luz e posteriormente suas leituras foram realizadas no leitor de microplacas de marca Thermo Plate a 650 nm.

A confecção do gráfico da curva padrão, equação da reta, R² e análise dos resultados foram realizados em Excel 2013. O teste foi realizado em triplicata e os resultados expressos em média e DP.

4.9 Teste de quantificação de Flavonóides totais nos extratos brutos de *Mangifera indica* e *Annona crassiflora*

Para a quantificação de flavonóides totais nos extratos de *Mangifera indica* e *Annona crassiflora* foi aplicado o método colorimétrico do cloreto de alumínio (AlCl₃) segundo Chang e colaboradores, com modificações (CHANG *et al.*, 2002), utilizando placas e leitor de microplacas para leitura da absorbância.

Foram preparadas, em etanol P.A., as soluções estoques dos extratos de *Mangifera indica* e *Annona crassiflora* na concentração de 25 mg/mL e realizadas diluições seriadas de cada extrato, respectivamente, nas concentrações de 1,25 mg/mL, 0,75 mg/mL, 0,375 mg/mL e 5 mg/mL, 2,5 mg/mL, 1,25 mg/mL, as quais foram utilizadas no experimento. Preparou-se

também 10 mL de cloreto de alumínio a 10% (p/v) e 5 ml de solução de acetato de potássio 1 mol/L, ambos em água destilada.

Em uma placa de 96 poços foi adicionado 40 µL de etanol, 100 µL das soluções de amostras preparadas anteriormente, 4 µL da solução de cloreto de alumínio e igual volume da solução de acetato de potássio e, por fim, 52 µL de água destilada.

Para o preparo do branco foram pipetados nos poços correspondentes 100 µL das soluções de amostra, 44 µL de etanol P.A., 4 µL da solução de acetato de potássio e 52 µL de água destilada.

Para a curva padrão foi utilizado o padrão rotina, preparado em etanol P.A. na concentração de 0,2 mg/mL e foram preparados dez pontos nas concentrações de 2 µL/mL, 5 µL/mL, 10 µL/mL, 15 µL/mL, 20 µL/mL, 25 µL/mL, 30 µL/mL, 35 µL/mL, 40 µL/mL, 45 µL/mL, para ambas as espécies. O procedimento de preparo da curva padrão seguiu as mesmas instruções do procedimento de preparo das amostras.

As placas foram incubadas pelo prazo de 40 minutos em ambiente protegido da luz e posteriormente suas leituras foram realizadas no leitor de ELISA de marca Thermo Plate a 405 nm.

A confecção do gráfico da curva padrão, equação da reta, R^2 e análise dos resultados foram realizados em Excel 2013. O teste foi realizado em triplicata e os resultados expressos em média e DP.

4.10 Teste de avaliação de Taninos nos extratos brutos de *Mangifera indica* e *Annona crassiflora*

Para a quantificação de taninos nos extratos de *M. indica* e *A. crassiflora* foram preparadas soluções metanólicas nas concentrações 5 mg/mL, 2,5 mg/mL e 1,25 mg/mL a partir da diluição seriada da solução mãe de 25 mg/mL para ambas as espécies; e solução de vanilina (mistura de vanilina 4% em metanol e HCl 8% em metanol, 1:1) em quantidades suficientes para a realização da técnica.

Foram adicionados em placas de 96 poços 50 µL das amostras e 200 µL da solução de vanilina, ambas preparadas anteriormente.

O branco foi elaborado para cada concentração contendo 50 µL da amostra e 200 µL de metanol.

Para a curva padrão foi utilizado o padrão catequina, preparado em metanol na concentração de 1,0 mg/mL e foram preparados dez pontos nas concentrações de 20 µg/mL, 30 µg/mL, 40 µg/mL, 50 µg/mL, 60 µg/mL, 70 µg/mL, 80 µg/mL, 100 µg/mL, 120 µg/mL, 140 µg/mL, para ambas as espécies. O procedimento de preparo da curva padrão seguiu as mesmas instruções do procedimento de preparo das amostras e todos os pontos foram analisados em triplicata.

As placas foram incubadas pelo prazo de 20 minutos em ambiente protegido da luz e posteriormente suas leituras foram realizadas no leitor de ELISA de marca Thermo Plate a 490 nm.

A confecção do gráfico da curva padrão, equação da reta, R^2 e análise dos resultados foram realizados em Excel 2013. O teste foi realizado em triplicata e os resultados expressos em média e DP.

4.11 Formulação cosmética e incorporação do extrato de *M. indica* e *A. crassiflora*

A forma farmacêutica selecionada para a base cosmética foi uma emulsão O/A não-iônica, cuja formulação se apresenta na tabela 1.

Tabela 1 Componentes da formulação da base cosmética

Fase A	
Componente	%
Lipomulse 165	7,0
Óleo de soja	6,0
Triglicérides ácido cáprico/caprílico	6,0
Álcool cetoestearílico	2,0
Polawax NF	3,0
Tocoferol	0,2
Fase B	
Componente	%
Propileno glicol	4,0
EDTA	0,1
H ₂ O destilada	Q.S.P.

Os itens de cada fase foram pesados, adicionados em seus respectivos recipientes e levados a banho-maria até que cada fase estivesse homogênea e atingido 75°C.

Após retiradas do banho-maria, a fase B foi vertida na fase A e o conteúdo foi colocado em agitador a 500 RPM até resfriamento. A formulação foi armazenada a temperatura ambiente por 24h até completa estabilização da emulsão.

Foi adicionado à base 3% dos extratos de *M. indica* e *A. crassiflora* na proporção 1:1 e homogeneizados em um gral de vidro.

A amostra contendo ambos os extratos foi armazenada em temperatura ambiente até próximas análises.

4.12 Testes microbiológicos

5.12.1 Cultura de bactérias

As bactérias selecionadas para este projeto foram aquelas que se mostraram mais prevalentes na microbiota da pele de acordo com o referencial bibliográfico pesquisado, sendo elas *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923), *Staphylococcus epidermidis* (ATCC12228), *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 27853) e *Escherichia coli* (ATCC 25922). Os microrganismos selecionados foram cultivados no laboratório de microbiologia da Universidade Federal de Ouro Preto, em um primeiro momento em ágar nutritivo e, posteriormente, semeadas em ágar Mueller Hinton para sua utilização nos testes a seguir.

4.12.2 Triagem da atividade antimicrobiana dos extratos brutos de *Mangifera indica* e *Annona crassiflora*

O método escolhido para a realização da triagem antimicrobiana de ambos os extratos brutos foi o método de triagem por difusão em ágar de OKUNJI e colaboradores (OKUNJI *et al.*, 1990).

Foram selecionadas as concentrações avaliadas de cada extrato, sendo para *Mangifera indica* 100 mg/mL, 50 mg/mL e 25 mg/mL e para *Annona crassiflora* 200 mg/mL, 100 mg/mL e 50 mg/mL. Os extratos, em suas respectivas concentrações, foram dissolvidos em DMSO a 2% em salina (NaCl 0,9%).

Foram preparadas quantidades necessárias de placas de petri contendo ágar Mueller Hinton e os inóculos de *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus epidermidis* e *Staphylococcus aureus* em salina autoclavada, de modo que se obteve

suspensões de turvação referente ao tubo 0,5 da escala McFarland (1×10^8 UFC/mL). Por fim, foram preparados os controles positivos, antibiótico tetraciclina (25 µg/mL) para os microrganismos *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis* e *Escherichia coli* e antibiótico Norfloxacino (10 µg/mL) para o microrganismo *Pseudomonas aeruginosa*. Foi utilizado DMSO para o controle negativo.

As placas contendo ágar Mueller Hinton previamente preparadas foram perfuradas com um sistema pipeta de Pasteur de vidro acoplada à uma bomba à vácuo, de modo que os orifícios ficassem padronizados com 6mm de diâmetro. Foram perfurados, em cada placa, 5 orifícios correspondentes, respectivamente, ao controle positivo, controle negativo e cada uma das concentrações dos extratos.

As placas foram inoculadas com as suspensões microbianas preparadas previamente, por semeadura de superfície, com auxílio de *swab* autoclavado.

Foram adicionados, com ponteiros autoclavados, 50 µL da amostra em suas respectivas concentrações, do controle positivo e do controle negativo. As placas foram incubadas em estufa a 37 ± 2 °C por 24 horas.

Após a incubação os halos foram medidos com o auxílio de uma régua. O teste foi realizado em triplicata e os resultados expressos como média do halo de inibição (mm) \pm desvio padrão. O teste foi realizado em triplicata.

4.12.3 Avaliação quantitativa da atividade microbiológica dos extratos brutos de *Mangifera indica*, *Annona crassiflora* e associação dos extratos

Para a determinação da concentração inibitória mínima (CIM) de ambos os extratos brutos e associação foi utilizado o método de microdiluição em caldo MH conforme orientações do *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI) e a metodologia de Ostrosky e colaboradores, com adaptações (CLSI, 2012; OSTROSKY *et al.*, 2008).

Os tubos experimentais e demais materiais foram previamente esterilizados em autoclave por 20 min. Foram preparados os inóculos em solução salina autoclavada para cada microrganismo, sendo eles *E. coli*, *P. aeruginosa*, *S. epidermidis* e *S. aureus* até que se obteve turvação equivalente ao tubo 0,5 da escala McFarland (1×10^8 UFC/mL), posteriormente as suspensões foram diluídas (1:100) em caldo Mueller Hinton até que se obteve uma suspensão a 1×10^6 UFC/mL, assim a concentração final de microrganismos nos tubos foi de 5×10^5 UFC/mL.

Os extratos de *A. crassiflora* e *M. indica* foram pesados em tubo tipo falcon estéril e dissolvidos em caldo MH com 2% de DMSO na concentração de 1000 mg/mL e a associação dos extratos foi pesada em tubo tipo falcon estéril e dissolvida em caldo MH com 2% de DMSO na concentração de 500 mg/mL para que a maior concentração avaliada no teste fosse de, respectivamente, 500 mg/mL e 250 mg/mL. Posteriormente foram adicionados 500 µL de caldo a partir do segundo tubo de ensaio utilizado e foi adicionado 1000 µL da amostra na concentração inicial ao primeiro tubo de ensaio. Foram realizadas diluições seriadas das amostras onde foram retirados 500 µL do conteúdo do primeiro tubo de ensaio, transferido para o seguinte e homogeneizando. Esse processo foi realizado até o último tubo de ensaio, de forma que fossem obtidas amostras nas concentrações de 500 mg/mL, 250 mg/mL, 125 mg/mL, 62,5 mg/mL, 31,25 mg/mL, de ambos os extratos e 250 mg/mL, 125 mg/mL, 62,5 mg/mL, 31,25 mg/mL, 15,62 mg/mL para a associação dos extratos.

Os tubos de controles do experimento foram preparados de forma que no controle de crescimento foram colocados 500 µL de caldo Mueller Hinton, no controle positivo foram adicionados 500 µL de antibiótico estreptomicina (100 µg/mL) para os tubos de ensaio correspondentes aos microrganismos *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis* e *Escherichia coli* e de antibiótico Norfloxacino (40 µg/mL) para os tubos correspondentes ao microrganismo *Pseudomonas aeruginosa*, no controle negativo foram adicionados 500 µL de caldo Mueller Hinton com 2% de DMSO e no controle de meio de cultura foram adicionados 1000 µL de caldo Mueller Hinton puro.

Após a adição de todos os elementos acima foram adicionados 500 µL da suspensão microbiana, exceto no controle do meio e tubos com associação de extratos, com cada microrganismo em seu respectivo tubo. Para os tubos com a associação de extratos foram pipetados 125 µL de cada suspensão de microrganismo, de forma que se obteve 500 µL de uma suspensão em co-cultura. As placas foram incubadas em estufa a 37°C por 24 horas.

Após o tempo de incubação o conteúdo de cada tubo foi repicado em placa de Petri contendo ágar Mueller Hinton e, os conteúdos dos tubos contendo co-cultura foram repicados também em meio ágar seletivo sendo eles, microrganismos do gênero *Staphylococcus* foi usado ágar manitol hipertônico, *Escherichia coli* foi usado ágar MacConkey e *Pseudomonas aeruginosa* foi usado ágar cetrimida. Essas placas foram incubadas em estufa a 37°C por 24 horas para leitura e foram consideradas como CIM a menor concentração em que não houve crescimento microbiano. O teste foi realizado em triplicata.

4.12.4 Avaliação da atividade prebiótica da associação dos extratos brutos de *Mangifera indica* e *Annona crassiflora*

Para avaliar a atividade prebiótica dos extratos brutos de *M. indica* e *A. crassiflora* foi realizado um desenho experimental baseado no teste de CIM e foram analisados o comportamento de ambas as espécies em associação em relação aos microrganismos isolados e em co-cultura.

Os tubos experimentais e demais materiais foram previamente esterilizados em autoclave por 20 min. Foram preparados os inóculos em solução salina autoclavada para cada microrganismo, sendo eles *E. coli*, *P. aeruginosa*, *S. epidermidis* e *S. aureus* até que se obteve turvação referente ao tubo 0,5 da escala McFarland (1×10^8 UFC/mL), posteriormente as suspensões foram diluídas (1:100) em caldo Mueller Hinton até que se obteve uma suspensão a 1×10^6 UFC/mL, assim a concentração final de microrganismos nos tubos foi de 5×10^5 UFC/mL.

Os extratos de *A. crassiflora* e *M. indica* foram pesados em tubo tipo falcon estéril e dissolvidos em caldo MH com 2% de DMSO na concentração de 62,5 mg/mL e em associação. Posteriormente foram adicionados 500 µL da amostra previamente preparada em tubos de ensaio.

Os tubos de controles do experimento foram preparados de forma que no controle de crescimento foram colocados 500 µL de caldo Mueller Hinton, no controle positivo foram adicionados 500 µL de antibiótico estreptomicina (100 µg/mL) para os tubos de ensaio correspondentes aos microrganismos *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis* e *Escherichia coli* e de antibiótico Norfloxacino (40 µg/mL) para os tubos correspondentes ao microrganismo *Pseudomonas aeruginosa*, no controle negativo foram adicionados 500 µL de caldo Mueller Hinton com 2% de DMSO e no controle de meio de cultura foram adicionados 1000 µL de caldo Mueller Hinton puro.

Após a adição de todos os elementos acima foram adicionados 500 µL da suspensão microbiana, exceto no controle do meio e tubos referentes à co-cultura, com cada microrganismo em seu respectivo tubo. Para os tubos referentes à co-cultura foram pipetados 125 µL de cada suspensão de microrganismo, de forma que se obteve 500 µL de uma suspensão contendo todos os microrganismos e uma mesma concentração. As placas foram incubadas em estufa a 37°C por 24 horas.

Após o tempo de incubação o conteúdo de cada tubo foi repicado com alça calibrada em placa de Petri contendo ágar Mueller Hinton e, os conteúdos dos tubos contendo colônias

isoladas de microrganismos foram repicados também em meio ágar seletivo sendo eles, microrganismos do gênero *Staphylococcus* foi usado ágar manitol hipertônico, *Escherichia coli* foi usado ágar MacConkey e *Pseudomonas aeruginosa* foi usado ágar cetrimida. Essas placas foram incubadas em estufa a 37°C por 24 horas para leitura e foram avaliadas o crescimento microbiano em cada amostra a partir do número de colônias que se apresentaram. O teste foi realizado em triplicata.

4.13 Citotoxicidade

4.13.1 Cultivo celular e plaqueamento

A citotoxicidade foi avaliada em culturas de fibroblastos murinos L929. Para o cultivo das células foram utilizados meio RPMI 1640 (Sigma®) contendo 10% de soro fetal bovino (Vitrocell®) e gentamicina 60 µg/L, pH 7,22. As culturas foram incubadas em estufa a 37 °C com 5% de CO₂ por 48 horas ou até o tempo necessário para obter 80% ou mais de crescimento celular, trocando o meio quando o mesmo apresentava mudança de coloração (róseo-laranja para amarelo).

Após o crescimento e expansão das células, foi preparada a solução estoque (5×10^5 de células/ mL) em meio RPMI com fenol completo. Para o preparo da solução estoque, o meio de cultura foi descartado e as células foram desprendidas do frasco de cultura celular por raspagem com auxílio do suporte plástico (*cell scraper*), em seguida, foram adicionados aproximadamente 20 mL de meio RPMI completo para a homogeneização. A solução foi centrifugada a 1300 rpm por 07 minutos, o sobrenadante foi descartado e adicionou-se novamente aproximadamente 20 mL de meio RPMI completo para a homogeneização em vórtex.

Para a quantificação das células, as mesmas foram diluídas 20x em meio RPMI completo. E uma alíquota de 10 µL foi adicionada à câmara de Neubauer para a contagem. Após a devida diluição de forma a obter uma solução com 5×10^5 células/mL de meio RPMI, foram pipetados 100 µL da mesma em cada poço da placa de cultura de 96 poços estéril. A placa foi incubada em estufa de CO₂ por 24 horas para que as células aderissem na mesma. Após esse período, o meio foi retirado e as placas foram lavadas com meio RPMI sem fenol completo.

4.13.2 Citotoxicidade em fibroblastos L929

Após o cultivo celular e o plaqueamento das células descritos no item anterior, 100 µL das amostras previamente solubilizadas em meio RPMI nas concentrações de 1000 a 0,0024 mg/mL, foram adicionadas em triplicata às placas. Para facilitar a solubilização do extrato e fração foi utilizado meio RPMI contendo 10% de DMSO. Posteriormente, as placas foram incubadas por 24 h, 48 h e 72 h. O meio foi removido e os poços foram cuidadosamente lavados duas vezes com PBS pH 7,2. As células foram então fixadas por adição de 100 µL de ácido tricloroacético a 20% frio durante 1 h a 4 °C. Após este tempo, a placa foi lavada com água destilada e seca.

As células fixadas foram coradas durante 30 min com 40 µL de SRB 0,1 % solubilizado em ácido acético a 1 %. A placa foi então lavada com ácido acético a 1 %, novamente deixada secar e foram adicionados 200 µL de tampão Tris 10 mM (pH 10,5) para solubilizar a coloração, sob abrigo de luz. Depois de aproximadamente 30 min a temperatura ambiente, a absorbância das amostras foi lida a 490 nm em leitor de microplacas (Molecular Devices – SpectraMAX 340) e os valores foram expressos como porcentagem de viabilidade em relação ao controle (células não tratadas) (SKEHAN et al., 1990).

4.14 Avaliação da formulação

4.14.1 Teste de centrifugação

Foram pesados em tubo Falcon 5g de formulação contendo a associação dos extratos de *M. indica* e *A. crassiflora* e 5g de formulação sem a adição dos extratos. Os tubos foram adicionados à centrífuga e deixada por 30 min a 4000 RPM. O teste foi realizado em triplicata.

4.14.2 Avaliação do comportamento reológico

A avaliação do comportamento reológico das formulações foi realizada em reômetro Brookfield® DV-III Ultra, utilizando o aparato Cone Plate (CP-52), variando as rotações por minuto (RPM) de 10-30, com intervalo 5 rpm e de 30 segundos para a mudança de velocidade

de rotação, utilizando 0,5 mL de formulação e temperatura 20°C. O teste foi realizado em triplicata para cada formulação.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Caracterização do material vegetal

A caracterização do material vegetal é de grande importância para a verificação da qualidade da folha (WHO, 2002), sendo a de *M. indica* realizada de acordo com a Farmacopeia Brasileira (2019). Seus resultados se encontram na tabela 2 e 3 e figura 1 abaixo.

Na tabela 2 tem-se os teores de cinzas, umidade e perda por dessecação, em porcentagem, seguidos de seu desvio padrão (DP), sendo respectivamente $10,6094 \pm 0,2378$; $0,4190 \pm 0,0175$ e $0,4766 \pm 0,0603$.

O teor de cinzas obtido pelo grupo de pesquisa presente se apresenta maior quando comparado ao estudo de Rakholiya e Chanda (2012), onde se observou valor de $9,6 \pm 0,58$. A diferença entre os valores observados pode se dar pelo solo em que a folha foi coletada, uma vez que o grupo de pesquisa obteve o material vegetal em uma área rica em minério, o que pode aumentar a matéria inorgânica não-volátil em sua composição (ANDRADE, L. N.; LEITE, M. G. P.; BACELLAR, L. A. P., 2012).

Os valores encontrados para o teor de umidade e perda por dessecação foram próximos, o que mostra aproximadamente a mesma proporção entre água livre e água ligada presente no material vegetal. Estes valores corroboram com o encontrado por Anitha e Suja (2015), onde o teor de umidade foi de 0,4%.

Tabela 2 Caracterização da folha de *M. indica* seca e pulverizada

Ensaio	(%) \pm DP
Teor de cinzas	$10,6094 \pm 0,2378$
Teor de umidade	$0,4190 \pm 0,0175$
Perda por dessecação	$0,4766 \pm 0,0603$

Na tabela 3, assim como na figura 3, tem-se o resultado do teste de granulometria realizado também com base na Farmacopeia Brasileira (2019) onde é possível observar o tamanho da malha de tamis utilizada e a porcentagem de folha retida em cada uma. Neste sentido, a pulverização ficou heterogênea, visto que há uma distribuição do pó por todos os tamises. Contudo, é possível observar a maior retenção de pó no tamis de malha 0,5 mm, sendo considerado, de acordo com a Farmacopéia Brasileira (2019) um pó grosso.

O tamanho da partícula do pó afeta diretamente o rendimento da extração, no caso, um pó grosso possui uma área de contato menor, diminuindo a interação da partícula com o solvente e prejudicando a obtenção dos compostos de interesse (MACÊDO et al., 2020). No caso da extração realizada para este projeto o tamanho da partícula não foi relevante, visto que os compostos fitoquímicos encontrados no extrato se mostraram aproximados ou maiores que os encontrados na literatura, como será possível observar no tópico abaixo.

Tabela 3 Quantidade de material vegetal retido em cada malha de tamis de diferentes tamanhos

Malha (mm)	% de material retido/ tamis
1,19	0
0,59	8
0,5	35,84
0,42	12,8
0,21	22,92
0,125	11,76
Fundo	7,44
Total	98,76

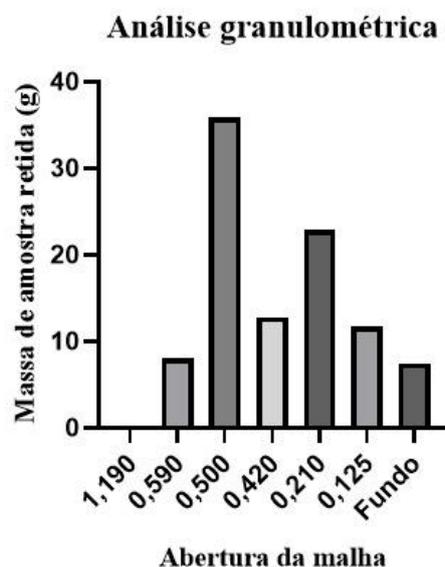


Figura 3 Análise granulométrica da folha seca e pulverizada de *M. indica*

Legenda: O gráfico acima mostra no eixo x a abertura da malha de cada tamis usado na avaliação e no eixo y a quantidade, em g, de amostra retida em sua respectiva malha.

5.2 Rendimento do extrato bruto de *Mangifera indica*

A partir da massa de 455g de folhas secas de *Mangifera indica* usada no preparo do EEB foram obtidos 104,89g de extrato, representando 23,05% de rendimento.

O rendimento apresentado neste método se apresentou próximo ao rendimento relatado por Toledo e colaboradores (2019), também no processo de percolação até a exaustão com o solvente etanol (TOLEDO *et al.*, 2019).

5.3 Rendimento do extrato bruto de *Annona crassiflora*

A partir da massa de 132,5g de polpa liofilizada da *Annona crassiflora* usada no preparo do EEB foram obtidos 59,89g de extrato, representando 45,05% de rendimento.

Um rendimento de 55,7% de polpa do fruto *in natura* foi apresentado por Cardoso e colaboradores (2011), sugerindo que o grupo de pesquisa presente obteve bom rendimento, considerando que o extrato foi obtido a partir da polpa liofilizada (CARDOSO, 2011).

5.4 Avaliação fitoquímica

Para a avaliação fitoquímica dos extratos etanólico bruto de *Mangifera indica* e *Annona crassiflora* foram escolhidos os métodos quantitativos de compostos fenólicos totais, flavonoides totais e taninos totais.

O método de quantificação de fenólicos totais usado foi a reação colorimétrica de Folin-Ciocalteu, que consiste na oxidação dos compostos fenólicos e redução do ácido fosfomolibdico-fosfotungstico em soluções alcalinas, a fim de que o grupo fenólico esteja na forma de fenolato, produzindo uma coloração azul, na qual tem sua tonalidade alterada de acordo com a quantidade de compostos fenólicos presentes na amostra (MUSCI; YAO, 2017; SANTOS, 2018).

O teste detecta todos os grupos fenólicos presentes no extrato, inclusive proteínas extraíveis, não sendo considerado específico e quantificação é realizada de acordo com o padrão ácido gálico e tem seu resultado expresso em equivalência de ácido gálico (mg EAG/g de EEB) (SINGLETON *et al.*, 1999; SANTOS, 2018).

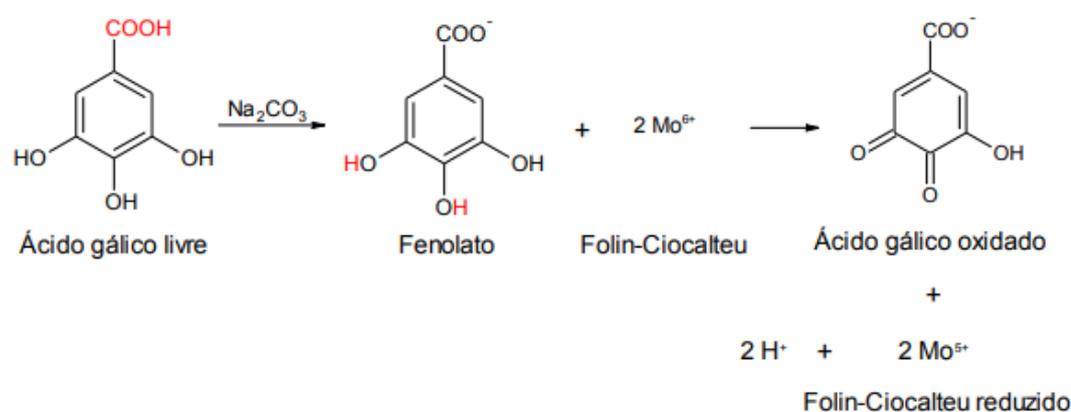


Figura 4 Equação química da reação entre o composto fenólico e o reagente de Folin-Ciocalteu

Fonte: Pires, 2017

O método de quantificação de flavonoides totais usado foi a reação colorimétrica a partir do cloreto de alumínio, que consiste na reação de complexação do cloreto de alumínio com o grupo hidroxila dos flavonoides, formando uma coloração amarelada e é avaliado de acordo com o padrão rutina, tendo seu resultado expresso em equivalência de rutina (mg ER/g

de EEB) (CHANG *et al.*, 2002; MAGALHÃES *et al.*, 2012; SANTOS, 2018; SHRAIM *et al.*, 2021).

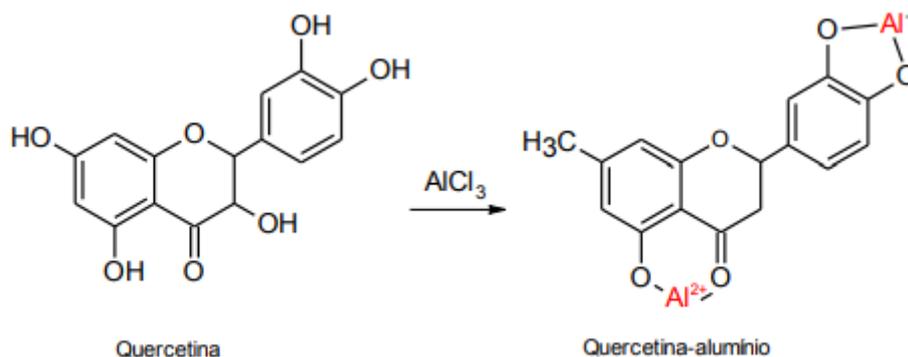


Figura 5 Equação química da reação de complexação entre flavonoide e o reagente complexante, cloreto de alumínio (AlCl₃)

Fonte: Pires, 2017

O método de quantificação de taninos totais usado foi a reação colorimétrica a partir da vanilina, que consiste na reação deste aldeído aromático com um anel aromático metasubstituído presente no extrato analisado, formando uma coloração vermelha e é avaliado de acordo com o padrão catequina, tendo seu resultado expresso em equivalência de catequina (mg CE/g de EEB). A quantificação de taninos por este método não é específica, já que qualquer polifenol metasubstituído é passível de sofrer reação (AMPARO, 2016; PEREZ *et al.*, 1999).

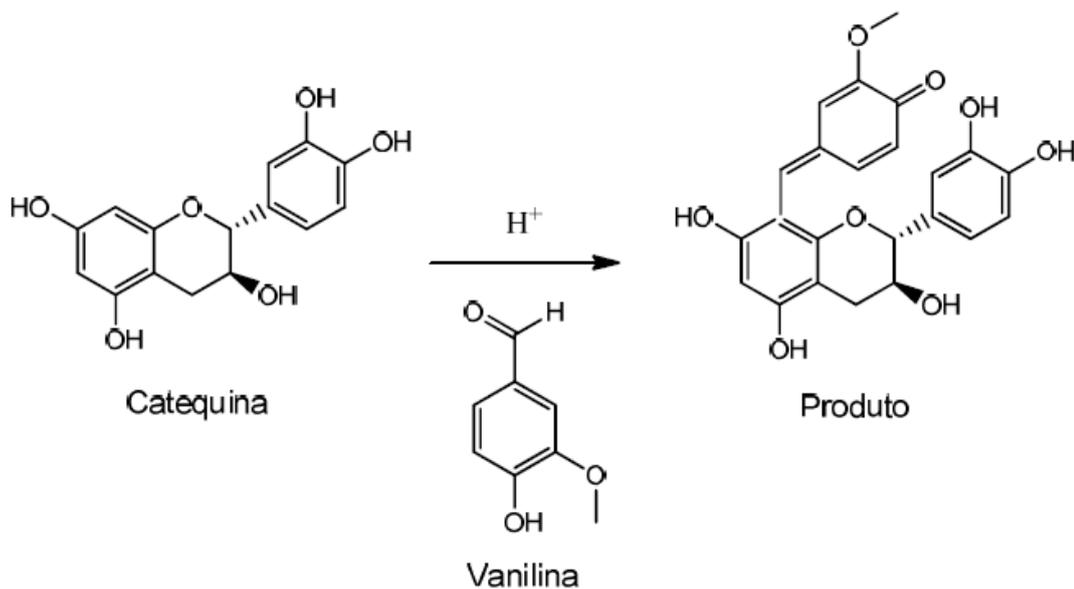


Figura 6 Reação de catequina com vanilina no método vanilina/HCl para determinação de taninos totais

Fonte: AMPARO, 2016

5.4.1 Teste de identificação de fenólicos totais no extrato bruto de *Mangifera indica*

No EEB das folhas da espécie *M. indica* foram quantificados compostos fenólicos totais em duas amostras com diferentes concentrações, respectivamente 1,25 mg/mL e 0,75 mg/mL. Para este teste foi obtida a equação da reta $Y=0,0031x+0,4937$, onde Y é a concentração de ácido gálico e x é o valor de absorbância em 650 nm. O coeficiente de correlação R^2 teve valor 0,9908. O resultado de equivalência de compostos fenólicos totais da amostra ao padrão de ácido gálico (mg EAG/ g de EEB) foi apresentado a partir da média ponderada e desvio padrão da triplicada analisada (Tabela 4) sendo os resultados para as concentrações 1,25 mg/mL, 370,09 mg/g \pm 63,13 e 0,75 mg/mL, 333,30 mg/g \pm 43,93.

Tabela 4: Equivalência de fenólicos totais ao ácido gálico no EEB de *Mangifera indica*

$Y=0,0031x+0,4937 R^2=0,9908$		
<i>Concentrações (mg/ml)</i>	<i>Média (mg EAG/g EEB)</i>	<i>DP</i>
0,75	333,30	43,93
1,25	370,09	63,13

Os compostos fenólicos possuem um importante papel na cor e sabor do fruto da *Mangifera indica*, alguns possuem atividades antioxidantes e outros, como o ácido gálico, possuem atividades antiinflamatória, antialérgica, bactericida e outras. Nas folhas da espécie, o composto fenólico mais abundante é a mangiferina, responsável também por diversas atividades biológicas, dentre elas a atividade bactericida (BARRETO *et al.*, 2008; MASIBO; QIAN, 2008).

Assim, ao quantificar os compostos fenólicos no extrato bruto da folha da mangueira, já era esperado uma alta concentração da substância presente (BELIZÓN *et al.*, 2018), com valores em torno de 360 mg EAG /g EEB, como mostrado por Dhital e colaboradores (2017), sendo a amostra de concentração inicial 1mg/mL, preparada em metanol (SHARMA DHITAL *et al.*, 2017), mostrando que os valores encontrados nas concentrações de 1,25 mg/mL e 0,75 mg/mL estão de acordo com o que está apresentado na literatura.

5.4.2 Teste de identificação de Flavonoides totais no extrato bruto de *Mangifera indica*

No EEB das folhas da espécie *M. indica* foram quantificados flavonoides totais em duas amostras com diferentes concentrações, respectivamente 1,25 mg/mL e 0,75 mg/mL. Para este teste foi obtido a equação da reta $Y=0,0176x+0,1646$, onde Y é a concentração de ácido gálico e x é o valor de absorbância em 405 nm. O coeficiente de correlação R^2 teve valor 0,9979. O resultado de equivalência de flavonoides totais da amostra ao padrão rutina (mg ER/ g de EEB) foi apresentado a partir da média ponderada e desvio padrão da triplicada analisada (Tabela 5) sendo os resultados para as concentrações; 1,25 mg/mL, 43,09 mg/g \pm 5,01 e 0,75 mg/mL, 29,56 mg/g \pm 1,52.

Tabela 5: Equivalência de flavonoides totais ao padrão Rutina no EEB de *Mangifera indica*

$Y=0,0176x+0,1646 R^2=0,9979$		
<i>Concentrações (mg/ml)</i>	<i>Média (mg ER/g EEB)</i>	<i>DP</i>
0,75	29,56	1,52
1,25	43,09	5,01

Os flavonoides são metabólitos secundários amplamente encontrados nas plantas e possuem atividades biológicas e farmacológicas, como a atividade antifúngica relatada por Kanwal e colaboradores (2010) e atividade antioxidante relatada por Pan e colaboradores (2018) (KANWAL *et al.*, 2010; PAN *et al.*, 2018).

Ao realizar este teste, já era esperado encontrar os flavonoides no EEB da *Mangifera indica* como relatado anteriormente por Anila e colaboradores (2003) e Wilberforce e colaboradores (2017) (ANILA; VIJAYALAKSHMI, 2003; OTI WILBERFORCE; NKECHINYERE OLIVIA, 2017), em concentrações aproximadas de 55,63 mg/g de amostra, como mostrou Dihital e colaboradores (2017) ao analisar uma amostra de concentração 2mg/ml preparada em metanol (SHARMA DHITAL; KHUMA SHARMA DHITAL, 2017), assim as médias de flavonoides encontrados para as respectivas concentrações analisadas estão de acordo com a literatura.

5.4.3 Teste de identificação de compostos fenólicos totais e flavonóides totais no extrato bruto de *Annona crassiflora*

No EEB das folhas da espécie *A. crassiflora* foram quantificados compostos fenólicos totais em três amostras com diferentes concentrações, respectivamente 5,0 mg/mL; 2,5 mg/mL e 1,25 mg/mL. Para este teste foi obtido a equação da reta $Y=0,0085x+0,2165$, onde Y é a concentração de ácido gálico e x é o valor de absorbância em 650 nm. O coeficiente de correlação R^2 teve valor 0,992. O resultado de equivalência de compostos fenólicos totais da amostra ao padrão de ácido gálico (mg EAG/ g de EEB) foi apresentado a partir da média ponderada e desvio padrão da triplicada analisada (Tabela 6) sendo os resultados para as concentrações 5,0 mg/mL, 15,99 mg/g \pm 2,01837; 2,5 mg/mL, 8,843 mg/g \pm 2,176736 e 1,25 mg/mL, 2,627 mg/g \pm 13,64773.

Tabela 6 Equivalência de fenólicos totais ao ácido gálico no EEB de *Annona crassiflora*

$Y=0,0085x+0,2165 R^2=0,992$		
<i>Concentrações (mg/ml)</i>	<i>Média (mg EAG/g EEB)</i>	<i>DP</i>
5,0	15,990	2,01837
2,5	8,843	2,176736
1,25	2,627	13,64773

Na quantificação de compostos flavonoides totais do extrato etanólico bruto da polpa de *Annona crassiflora*, em todas as concentrações testadas (5 mg/mL; 2,5 mg/mL e 1,25 mg/mL), não foram encontrados valores significativos de equivalentes de rutina (mg ER/g EEB), dessa forma o resultado foi considerado igual a 0 g ER/g EEB para a análise de cada composto. Para este teste foi obtido a equação da reta $y = 0,0127x + 0,1503$, onde Y é a concentração de rutina e x é o valor de absorbância em 405 nm. O coeficiente de correlação R² teve valor 0,992.

Segundo Clerice e colaboradores (2011) e Prado e colaboradores (2020) a polpa da fruta *Araticum* é rica em carotenoides, vitaminas e oligossacarídeos, com atividades moluscicida e bactericida já descritas pela literatura (CLERICI; CARVALHO-SILVA, 2011; PRADO *et al.*, 2020).

O resultado encontrado pelo grupo de pesquisa já era esperado, de acordo com o que se apresenta na literatura, onde pesquisadores encontraram quantidades de compostos fenólicos em concentrações de 0,0262g GAE/g de extrato e quantidades de flavonoides em concentrações 0,0179 g CE/g de extrato, sendo CE correspondente a equivalente de catequina, padrão utilizado pela referência. Essas diferenças nos resultados podem acontecer na concentração de metabólitos secundários das espécies devido à época da colheita e solo de cultivo, entre outros fatores (ARRUDA, H. S.; PEREIRA; PASTORE, 2018; GOBBO-NETO; LOPES, 2007).

5.4.4 Teste de identificação de Taninos nos extratos brutos de *Mangifera indica* e *Annona crassiflora*

Na quantificação de compostos taninos totais do EEB da polpa de *A. crassiflora* e da folha de *M. indica*, em todas as concentrações testadas (5 mg/mL; 2,5 mg/mL e 1,25 mg/mL), não foram encontrados valores significativos de equivalentes de catequina (mg CE/g EEB), dessa forma o resultado foi considerado igual a 0 g CE/g EEB para a análise de cada

composto. Para este teste foi obtido a equação da reta $y = 0,001x + 0,101$, onde Y é a concentração de catequina e x é o valor de absorvância em 490 nm. O coeficiente de correlação R^2 teve valor 0,9901.

Estudos da polpa do fruto de *A. crassiflora* apresentam quantidade de taninos no valor de 13,51 CE/g de extrato, entretanto este metabólito secundário é considerado um marco de amadurecimento e sua quantidade diminui a medida do tempo, assim o resultado encontrado pelo grupo de pesquisa é esperado, visto que o objetivo foi estudar a polpa madura (AYO-OMOGIE, H. N. et al, 2010; ARRUDA, H. S. e PASTORE, G. M., 2019; Ó-MARQUES, J. et al., 2005).

Segundo Samanta e colaboradores (2019) a folha de *M. indica* possui $0,45 \pm 0,10$ mg/100g de taninos, corroborando com a avaliação atual em que a quantidade de taninos na folha da mangueira foi considerada zero (SAMANTA, S. et al., 2019).

5.5 Testes microbiológicos

5.5.1 Cultura de microrganismos

Os microrganismos foram selecionados de acordo com a sua prevalência na pele e sua importância na saúde da derme, de acordo com a composição da microbiota cutânea apresentada no tópico de revisão de literatura.

Um dos gêneros mais presentes na microbiota da pele é o *Staphylococcus*. Dentre as espécies pertencentes a este gênero tem-se que *Staphylococcus epidermidis* que está entre as bactérias comensais mais presentes e promove a defesa da pele, produzindo moléculas antimicrobianas que inibem seletivamente bactérias com alto índice de patogenicidade, como exemplo, a *Staphylococcus aureus* que também está entre as espécies mais presentes na microbiota cutânea e é responsável por doenças como a Dermatite atópica (DI LODOVICO et al., 2021; PARLET; BROWN; HORSWILL, 2019; POPOV et al., 2014).

A *Pseudomonas aeruginosa* é uma bactéria Gram-negativa transitória na microbiota da pele, não fazendo parte de fato do microbioma, mas sendo frequentemente encontrada no local. É um microrganismo considerado patogênico oportunista que causa doença caso exista lesão prévia ou imunocomprometimento do indivíduo e tem-se também importante papel na dermatite atópica (GARCIA et al., 2018; GRICE et al., 2008; KNACKSTEDT; KNACKSTEDT; GATHERWRIGHT, 2020a).

A bactéria gram-negativa *Escherichia coli* é residente, comensal e prevalente na porção final do intestino humano, podendo fazer parte de forma transitória na microbiota cutânea. Uma vez na pele a *E. coli* pode se instalar e começar sua proliferação por oportunismo, caso as condições locais sejam favoráveis, causando assim infecções cutâneas (DENAMUR *et al.*, 2021; HERMAN; HERMAN, 2019).

5.5.2 Triagem da atividade antimicrobiana dos extratos brutos de *Mangifera indica* e *Annona crassiflora*

O método escolhido para triagem atividade antimicrobiana dos extratos foi o método de perfusão em ágar, já que este incorpora diferentes concentrações da amostra preparada e consiste na capacidade do extrato permear no ágar e possibilitar o contato do microrganismo com a amostra, sendo possível avaliar a atividade antimicrobiana de acordo com o tamanho do halo de inibição formado (KENNY; FUREY; LUCEY, 2015).

Os resultados da atividade antimicrobiana, em mm de diâmetro do halo de inibição, de cada extrato em suas respectivas concentrações, para cada uma das bactérias testadas são relatados de forma geral na Tabela 7 e nos tópicos a seguir são apresentados resultados e discussões para cada espécie, separadamente.

Tabela 7: Resultado da atividade antimicrobiana, em mm do diâmetro do halo de inibição, dos EEBs de *Mangifera indica* e *Annona crassiflora* em suas respectivas concentrações

Concentrações do EEB (mg/mL)	<i>Mangifera indica</i>					<i>Annona crassiflora</i>				
	C+	C-	100	50	25	C+	C-	200	100	50
<i>Escherichia coli</i>	17	0	0	0	0	19	0	0	0	0
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	25	0	14	13	12	26	0	0	0	0
<i>Staphylococcus epidermides</i>	20	0	19	16	14	20	0	10	0	0
<i>Staphylococcus aureus</i>	22	0	20	17	15	20	0	9	0	0

Legenda: Controle positivo (C+) – antibiótico tetraciclina (25 µg/mL) para os microrganismos *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermides* e *Escherichia coli* e antibiótico Norfloxacino (10 µg/mL) para o microrganismo *Pseudomonas aeruginosa*. Controle negativo (C-) – DMSO.

5.5.2.1 Avaliação do extrato etanólico bruto de *Mangifera indica*

Ao a triagem do extrato etanólico bruto de *Mangifera indica* em relação às espécies *Escherichia coli* (figura 7A), *Pseudomonas aeruginosa* (figura 7B), *Staphylococcus epidermides* (figura 7C) e *Staphylococcus aureus* (figura 7D) foi possível observar os halos de inibição na área do controle positivo de 17mm, 25mm, 20mm e 22mm, respectivamente, e a ausência dos halos na área do controle negativo, mostrando que o teste foi válido e confiável.

Assim, de acordo com as concentrações analisadas de 100 mg/mL, 50 mg/mL e 25 mg/mL, respectivamente, foi possível observar para a espécie *E. coli* a ausência dos halos de inibição, para *P. aeruginosa* halos de inibição de 14mm, 13mm e 12mm, para *S. epidermides* halos de inibição de 19mm, 16mm, 14mm e para *S. aureus* halos de inibição de 20mm, 17mm e 15mm.

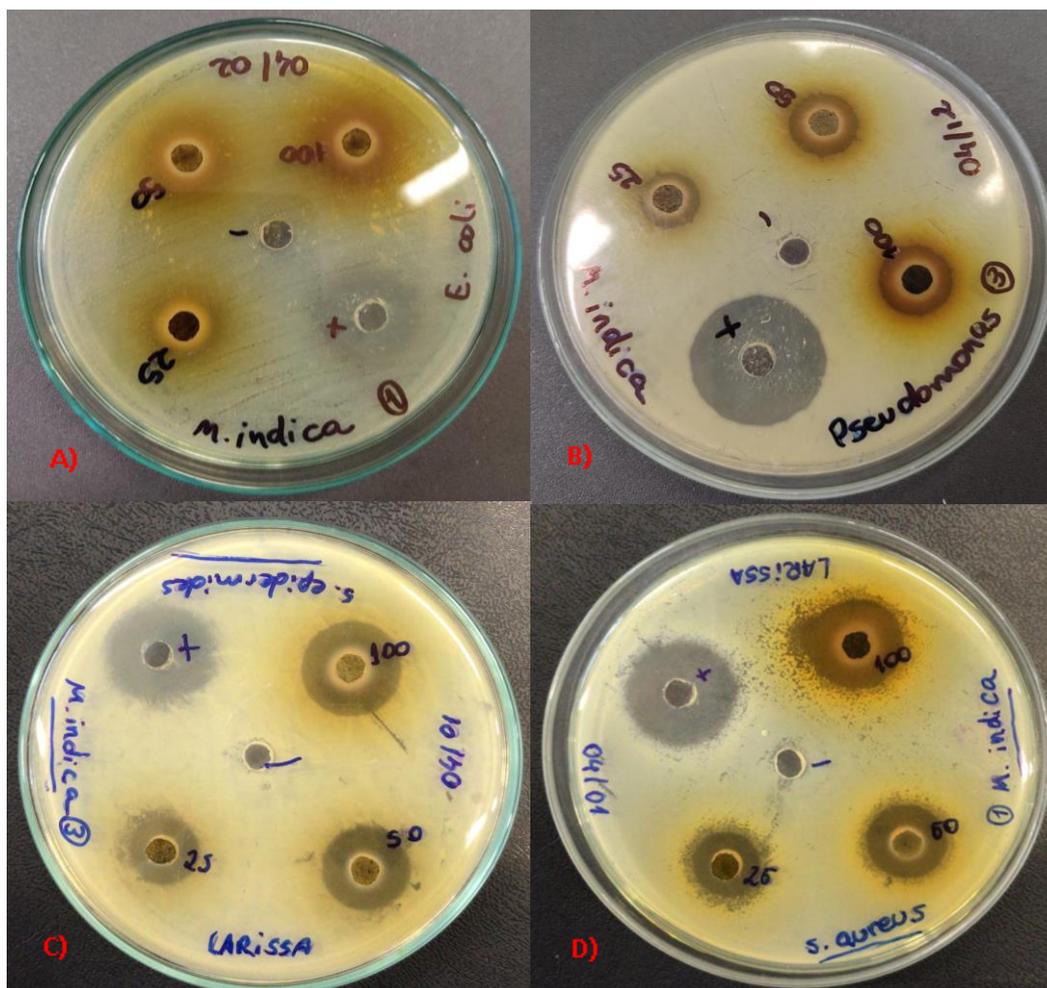


Figura 7 Triagem da atividade antimicrobiana do extrato das folhas de *M. indica* em concentrações de 100 mg/mL, 50 mg/mL e 25 mg/mL.

Legenda: A) Placa referente ao microrganismo *E. coli*. B) Placa referente ao microrganismo *P. aeruginosa*. C) Placa referente ao microrganismo *S. epidermides*. D) Placa referente ao microrganismo *S. aureus*. Fonte: autoria própria

As folhas de *Mangifera indica* são utilizadas pela medicina tradicional para tratar diabetes, bronquite, diarreia, problemas respiratórios entre outros e, a maior parte de sua atividade biológica é conferida por seu composto fenólico Mangiferina, cuja atividade

bactericida já foi previamente relatada na literatura (CARDENAS *et al.*, 2020; KUMAR *et al.*, 2021).

Doughari e colaboradores (2008) relataram atividade bactericida do extrato metanólico da folha de *Mangifera indica* contra bactérias do gênero *Staphylococcus*, *Pseudomonas* e *Escherichia*, dados também apresentados por outros pesquisadores posteriormente em diferentes extratos, como o etanólico e aquoso (BATOOL *et al.*, 2018; KUMAR *et al.*, 2021; DOUGHARI; MANZARA, 2008).

O estudo de triagem da atividade antimicrobiana do extrato etanólico de *Mangifera indica* realizado por Wilberforce e colaboradores (2017) apresenta resultados que sustentam os valores de halos de inibição encontrados por este grupo de pesquisa para os microrganismos dos gêneros *Pseudomonas* e *Staphylococcus* (OTI WILBERFORCE; NKECHINYERE OLIVIA, 2017).

Os resultados observados para *Escherichia coli* mostram que o EEB da espécie em discussão não apresenta atividade bactericida contra o microrganismo, diferindo dos trabalhos citados anteriormente, entretanto corroborando com os resultados apresentados por Cajado e colaboradores (2016). A diferença dos resultados entre os estudos pode se justificar pelo método de extração realizado, uma vez que a extração por solventes diferentes resultam na obtenção de compostos ativos também diferentes, também pode se justificar pela *E. coli* ser um microrganismo gram-negativo, adquirindo maior resistência aos compostos ativos pela característica de sua membrana (CAJADO *et al.*, 2016; TAHERI *et al.*, 2012).

5.5.2.2 Avaliação do extrato etanólico bruto de *Annona crassiflora*

Ao realizar a triagem da atividade qualitativa do extrato etanólico bruto de *Annona crassiflora* em relação às espécies *Escherichia coli* (figura 8A), *Pseudomonas aeruginosa* (figura 8B), *Staphylococcus epidermidis* (figura 8C) e *Staphylococcus aureus* (figura 8D) foi possível observar os halos de inibição na área do controle positivo de 19mm, 26mm, 20mm e 20mm, respectivamente, e a ausência dos halos na área do controle negativo, mostrando que o teste foi válido e confiável.

Assim, de acordo com as concentrações analisadas de 200 mg/mL, 100 mg/mL e 50 mg/mL, respectivamente, foi possível observar para a espécie *E. coli* e *P. aeruginosa* a ausência dos halos de inibição, para *S. epidermidis* a presença de halo de inibição de 10mm para a maior concentração e ausência de halos de inibição nas demais concentrações

analisadas, assim como *S. aureus* que foi observado a presença de halo de inibição de 9mm apenas para a maior concentração.

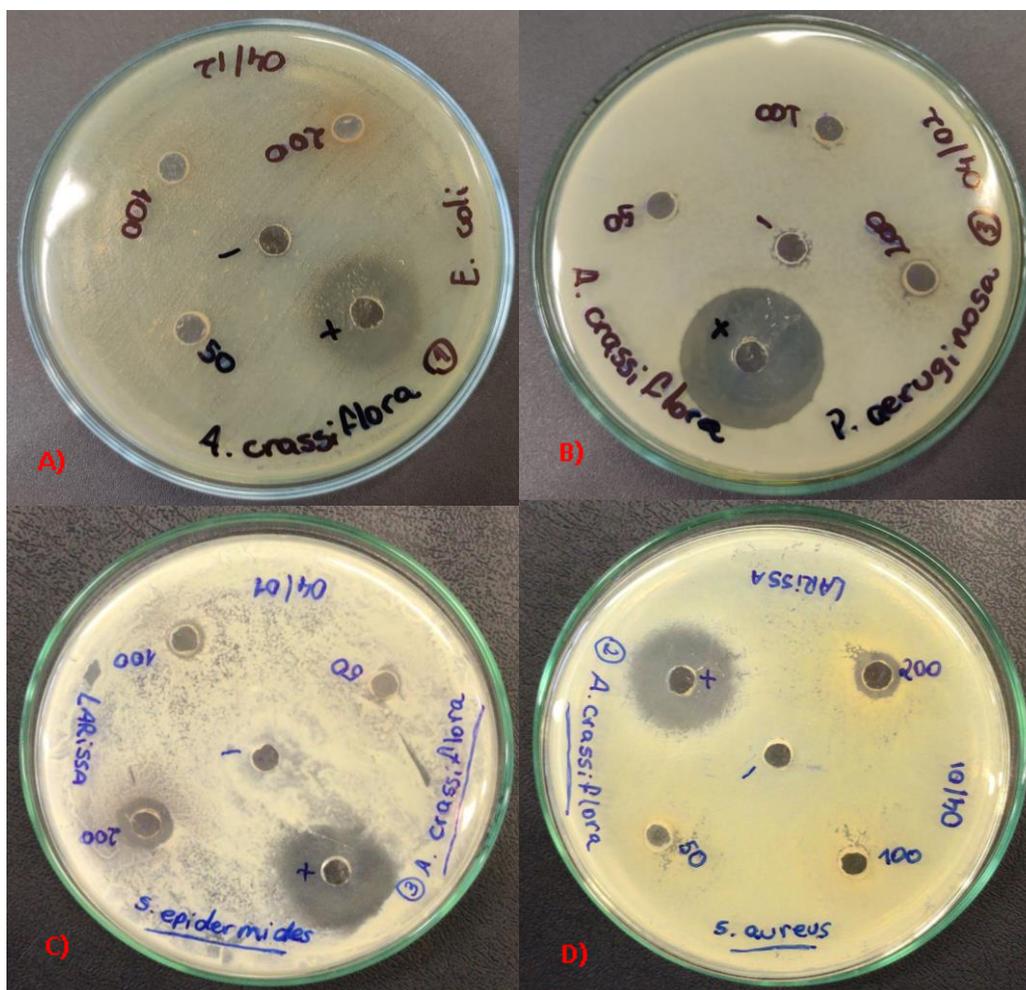


Figura 8 Triagem da atividade antimicrobiana do extrato das folhas de *A. crassiflora* em concentrações de 200 mg/mL, 100 mg/mL e 50 mg/mL.

Legenda: A) Placa referente ao microrganismo *E. coli*. B) Placa referente ao microrganismo *P. aeruginosa*. C) Placa referente ao microrganismo *S. epidermidis*. D) Placa referente ao microrganismo *S. aureus*. Fonte: autoria própria

A família Annonacea apresenta diversas atividades biológicas, dentre elas antitumorais, antioxidante e antimicrobiana, algumas destas possíveis pela presença de compostos fenólicos e flavonoides (ARRUDA, HENRIQUE SILVANO *et al.*, 2018; BIBA *et al.*, 2014).

Silva e colaboradores (2014) avaliaram o extrato da polpa de *A. crassiflora* na concentração 100 mg/mL e foi observado um halo de inibição de 14mm para o *S. aureus*.

mostrando que o extrato do araticum possui atividade bactericida em espécies de *Staphylococcus*, fato também observado nos resultados apresentados pelo presente grupo de pesquisa (DA SILVA, JEFERSON *et al.*, 2014).

No teste realizado neste trabalho não foram encontrados atividades bactericida para os microrganismos *E. coli* e *P. aeruginosa*, assim como Carrazza e colaboradores (2011) que avaliaram a atividade antimicrobiana das folhas da espécie *Annona crassiflora* em concentrações de 1mg/mL, 100µg/mL e 500µg/mL pela técnica de difusão em ágar em cepas de *E. coli*, microrganismo gram-negativo, onde não foi apresentado halos de inibição, corroborando também com os resultados apresentados (CARRAZZA *et al*, 2011).

5.5.3 Avaliação quantitativa da atividade microbiológica dos extratos brutos de *Mangifera indica*, *Annona crassiflora* e associação dos extratos

O método escolhido para avaliação quantitativa da atividade antimicrobiana dos extratos foi o método de microdiluição em tubos, baseado nas orientações do *Clinical and Laboratory Standards Institute*, com modificações, já que este incorpora diferentes concentrações da amostra preparada e determina a concentração inibitória mínima (CIM) e a concentração bactericida mínima (CBM) (CLSI, 2012).

Os resultados obtidos estão representados nas tabelas abaixo, para cada um dos microrganismos analisados. Tem-se como ‘√’ os controles que mostraram resultado dentro do esperado e ‘_’ para as amostras em que houve crescimento microbiológico em todas as concentrações testadas, não sendo possível determinas CIM e/ou CBM.

A análise dos resultados para o microrganismo *Staphylococcus aureus* (Tabela 8) e *Staphylococcus epidermides* (Tabela 9) mostram atividade para a espécie de *M. indica*, para o qual obtiveram-se para *Staphylococcus aureus* CIM de 125 mg/mL e CBM de 250 mg/mL e para *Staphylococcus epidermides* CIM de 250 mg/mL e CBM de 500 mg/mL.

Os resultados de CIM e CBM de ambos os extratos estão em desacordo com o que foi observado na triagem da atividade microbiana em que foi apresentado, para as duas espécies de *Staphylococcus*, *Annona crassiflora* ativa em concentrações acima de 200 mg/mL e *Mangifera indica* em concentrações acima de 25 mg/mL.

Na avaliação quantitativa o extrato de *A. crassiflora* mostrou-se inativo e, em maiores concentrações, o extrato de *M. indica* mostrou-se ativo, em ambas as espécies de *Staphylococcus*, de acordo com o que foi observado no experimento presente. Tal mudança no perfil dos resultados pode ser explicada pelo fato de ambos os extratos apresentarem funções

bacteriostáticas, sendo no momento de contato com o extrato, como é o caso da avaliação qualitativa, eles são capazes de inibir o crescimento bacteriano em determinada concentração já citada anteriormente. Entretanto, ao finalizar este contato e avaliar o crescimento microbiológico em outro meio de cultura, como acontece durante a avaliação qualitativa, esses microrganismos voltam a crescer (BANCALARI *et al*, 2020; GOMES *et al*, 2020)

Para *M. indica* tal concentração que a faz ter a função bacteriostática se dá até 125 mg/mL para *S. aureus* e 250 mg/mL para *S. epidermidis* e, concentrações acima possuem características bactericidas. Para *A. crassiflora* não foram avaliadas concentrações em que se apresentaram essa variação, visto que houve crescimento bacteriano em todos os valores avaliados.

Tabela 8: Avaliação quantitativa da atividade microbiológica dos EEBs de *Annona crassiflora* e *Mangifera indica* em colônias de *Staphylococcus aureus*

<i>Staphylococcus aureus</i>							
Controles do experimento				CIM (mg/mL)		CBM (mg/mL)	
C+	C-	CM	CC	<i>Annona crassiflora</i>	<i>Mangifera indica</i>	<i>Annona crassiflora</i>	<i>Mangifera indica</i>
✓	✓	✓	✓	–	125	–	250

Tabela 9: Avaliação quantitativa da atividade microbiológica dos EEBs de *Annona crassiflora* e *Mangifera indica* em colônias de *Staphylococcus epidermidis*

<i>Staphylococcus epidermidis</i>							
Controles do experimento				CIM (mg/mL)		CBM (mg/mL)	
C+	C-	CM	CC	<i>Annona crassiflora</i>	<i>Mangifera indica</i>	<i>Annona crassiflora</i>	<i>Mangifera indica</i>
✓	✓	✓	✓	–	250	–	500

Para as colônias de *Escherichia coli* (Tabela 10) foi apresentada atividade apenas para o EEB de *Mangifera indica*, onde obteve-se CIM de 250 mg/mL e CBM de 500 mg/mL.

Os resultados encontrados para o EEB de *Annona crassiflora* estão de acordo com o apresentado pela triagem anterior e com o que foi observado na literatura através de outras espécies de frutas do gênero *Annona*, como Moraes e colaboradores (2021) relataram CIM >

8 mg/mL da polpa de atemoia, *Annona cherimoya* em cepas de *Escherichia coli*. O resultado encontrado para o EEB de *Mangifera indica* complementa o que foi apresentado na avaliação qualitativa, visto que no primeiro momento não há atividade, porém ao avaliar maiores concentrações no teste quantitativo foi possível observar CIM e CBM, assim como outros autores na literatura citados em tópicos anteriores (BATOOL *et al.*, 2018; KUMAR *et al.*, 2021; DE MORAES *et al.*, 2021; DOUGHARI; MANZARA, 2008).

Tabela 10: Avaliação quantitativa da atividade microbiológica dos EEBs de *Annona crassiflora* e *Mangifera indica* em colônias de *Escherichia coli*

<i>Escherichia coli</i>							
Controles do experimento				CIM (mg/mL)		CBM (mg/mL)	
C+	C-	CM	CC	<i>Annona crassiflora</i>	<i>Mangifera indica</i>	<i>Annona crassiflora</i>	<i>Mangifera indica</i>
✓	✓	✓	✓	–	250	–	500

Os resultados para o microrganismo *Pseudomonas aeruginosa* (Tabela 11) mostram atividade apenas para o EEB de *Mangifera indica*, onde obteve-se CIM de 62,5 mg/mL e CBM de 125 mg/mL.

Assim, a atividade apresentada pelos testes de triagem e quantitativo se complementam, indicando a ausência de atividade antimicrobiana do EEB de *Annona crassiflora* para as concentrações analisadas, como mostrado por Moraes e colaboradores (2021) onde foi observado CIM > 8 mg/mL da polpa de atemoia, *Annona cherimoya*, e presença de atividade antimicrobiana do EEB de *Mangifera indica*, como relatado por Bbosa e colaboradores (2007) onde foi observado CIM 4,4 mg/mL do EEB de *M. indica* em cepas de *P. aeruginosa* (BBOSA *et al.*, 2007; DE MORAES *et al.*, 2021).

Tabela 11: Avaliação quantitativa da atividade microbiológica dos EEBs de *Annona crassiflora* e *Mangifera indica* em colônias de *Pseudomonas aeruginosa*

<i>Pseudomonas aeruginosa</i>							
Controles do experimento				CIM (mg/mL)		CBM (mg/mL)	
C+	C-	CM	CC	<i>Annona crassiflora</i>	<i>Mangifera indica</i>	<i>Annona crassiflora</i>	<i>Mangifera indica</i>
v	v	v	v	–	62,5	–	125

Os resultados para a associação dos extratos, assim como a associação dos microrganismos (Tabela 12) mostram atividade bactericida e bacteristática para todas as espécies de microrganismo analisadas, onde obteve-se para *E. coli* e *P. aeruginosa* CIM de 62,5 mg/mL e CBM de 125 mg/mL e para as espécies do gênero *Staphylococcus* CIM de 125 mg/mL e CBM de 250 mg/mL.

A associação dos microrganismos foi capaz de diminuir em 50% a CIM e CBM dos extratos em duas espécies de bactérias, sendo elas *E. coli* e *S. epidermides*.

Tabela 12 Avaliação quantitativa da atividade microbiológica da associação dos EEBs de *Annona crassiflora* e *Mangifera indica* em amostra contendo *E. coli*, *P. aeruginosa*, *S. aureus* e *S. epidermides*

Co-cultura + Associação de amostras						
MOs	CIM (mg/mL)	CBM (mg/mL)	Controles do experimento			
			C +	C -	CM	CC
<i>E. coli</i>	62,5	125	v	v	v	v
<i>P. aeruginosa</i>	62,5	125	v	v	v	v
<i>S. aureus</i>	125	250	v	v	v	v
<i>S. epidermides</i>	125	250	v	v	v	v

5.5.4 Avaliação da atividade prebiótica da associação dos extratos brutos de *Mangifera indica* e *Annona crassiflora*

O método usado para avaliação da atividade prebiótica de ambos os extratos em associação foi baseado no método de microdiluição em tubos do teste anterior, com modificações para atender o objetivo desejado no tópico presente.

Para a obtenção dos resultados foram realizadas contagens de UFCs de cada uma das amostras em meio seletivo, onde apenas as amostras em co-cultura dos microrganismos apresentaram crescimento de ambas as espécies de *Staphylococcus* e *E. coli*, como apresentado na figura 9, sendo $2,17.10^7 \pm 2,44.10^7$ UFC/mL. As demais amostras tiveram o crescimento microbiológico inibido. Não houve crescimento de *P. aeruginosa* também na amostra em co-cultura, sendo possível observar na Figura 10 a ausência de colônias esverdeadas característica da espécie quando em AMH.

Tais resultados sugerem que o crescimento dos microrganismos na amostra em co-cultura se dá não pela associação dos extratos, mas sim pela simbiose entre as espécies, onde seu crescimento em comunidade favorece sua sobrevivência (ROSENBERG, E. e ZILBER-ROSENBERG, I., 2011; SHAPIRA, M., 2016).

Tabela 13 Avaliação quantitativa da atividade prebiótica da associação dos EEBs de *Annona crassiflora* e *Mangifera indica* em amostra contendo *E. coli*, *P. aeruginosa*, *S. aureus* e *S. epidermidis*

MO	UFC (UFC/mL) Média \pm DP
<i>E. coli</i>	0 ± 0
<i>P. aeruginosa</i>	0 ± 0
<i>S. aureus</i>	0 ± 0
<i>S. epidermidis</i>	0 ± 0
Co-cultura	$2,17.10^7 \pm 2,44.10^7$

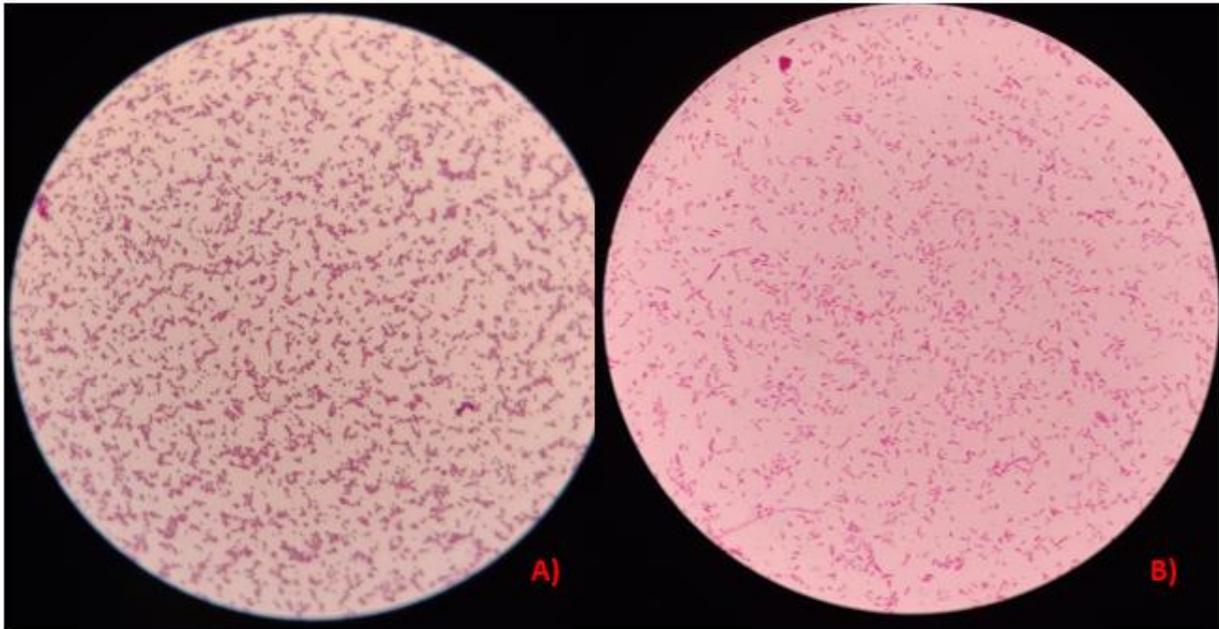


Figura 9 Colônias de microrganismos corada pela técnica de Gram

Legenda: A imagem acima representa dois tipos de colônias de bactérias, ambas coradas pela técnica de Gram. A) Mostra a presença de bactérias do gênero *Staphylococcus* Gram positivos. B) Mostra a presença de bactérias da espécie *E. coli* Gram negativa.

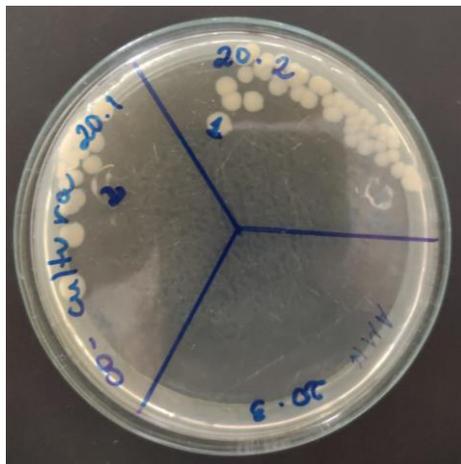


Figura 10 Placa com AMH e cultivo da amostra com co-cultura

Legenda: É possível observar colônias características de *Staphylococcus* e *E. coli* e ausência de colônias características de *P. aeruginosa*.

5.6 Citotoxicidade em fibroblastos L929

Fibroblastos são células presentes no tecido conjuntivo e um ser humano pode apresentar pelo menos três tipos de fibroblastos na pele (SORRELL, J. M. e CAPLAN, A. I., 2004). Sua função é essencial, uma vez que produz proteínas do tecido conjuntivo, como colágeno e elastina e tem uma função fundamental na cicatrização (TRACY, L. E., MINASIAN, R. A., & CATERSON, E. J., 2016). Assim, é de extrema importância avaliar o comportamento deste tipo celular frente a ambos os extratos, uma vez que o objetivo é usa-los para compor uma formulação para a pele (WERKMAN, 2009).

Ao entrar em contato com o extrato as células podem se manter viáveis ou não, dependendo da concentração analisada. O corante SRB se liga às proteínas das células viáveis e, a partir da leitura em espectrofotômetro, é possível encontrar o IC₅₀, valor que representa 50% de células viáveis (NADAL; KANUFRE, 2019).

É possível observar na Figura 11 a viabilidade celular em relação às concentrações testadas, de ambos os extratos em células murinas L929, onde foram determinados o IC₅₀ nos tempos de 24h, 48h e 72h, sendo para *A. crassiflora*, respectivamente, 14,94mg/mL, 0,7417mg/mL e 0,2868mg/mL e para *M. indica*, respectivamente, 2,754mg/mL, 46,08mg/mL e 1,751mg/mL.

Os perfis de ambos os gráficos são semelhantes, onde a viabilidade celular no tempo de 72h é maior que a viabilidade celular no tempo de 48h, o que pode ser explicado pela difícil solubilização dos extratos, uma vez que o teste foi iniciado em uma concentração elevada do mesmo, por ser um extrato vegetal onde se encontram diversas substâncias com diferentes perfis frente à célula e uma posterior adaptação das células frente às substâncias (MAHDI POUR, B., LATHA, L. Y. e SASIDHARAN, S., 2011; NOOR, S. A. et al., 2022).

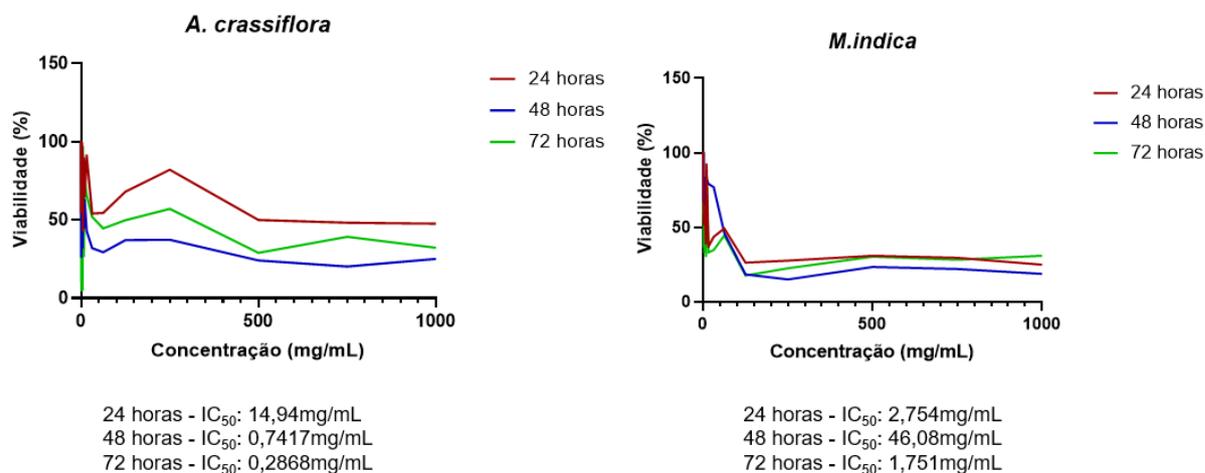


Figura 11 Gráficos representando a curva de viabilidade celular conforme a concentração em mg/mL para os EEBs nos tempos de 24, 48 e 72 horas.

5.7 Avaliação da formulação

5.7.1 Teste de centrifugação

A avaliação da estabilidade da emulsão foi realizada pelo teste de centrifugação, onde a aceleração das moléculas dentro do equipamento faz com que, caso haja algum problema na emulsão, ela se apresente imediatamente (LATREILLE, B., & PAQUIN, P.,1990; SMITH, A. L., & MITCHELL, D. P.,1976). Assim, como é possível observar na Figura 12, a amostra se mantém estável, não apresentando separação de fases, tanto em sua versão branca quanto em sua versão com a associação dos extratos. Portanto, a adição de 3% do extrato não é capaz de desestabilizar a formulação.



Figura 12 Amostras de formulação branca e com associação dos EEB antes e após a centrifugação

Legenda: A) Amostra de formulação branca antes da centrifugação. B) Amostra de formulação com associação dos EEBs antes da centrifugação. C) Amostra de formulação branca após a centrifugação. D) Amostra de formulação com associação dos EEBs após a centrifugação.

5.7.2 Avaliação do comportamento reológico

Ao avaliar o comportamento reológico de uma formulação, avaliamos como sua viscosidade se comporta sob a tensão do cisalhamento (PAL, 2011). Na Figura 13 é possível observar que a amostra de formulação sem o extrato (Figura 13A) possui o mesmo comportamento reológico que a amostra de formulação com a associação dos extratos (Figura 13B).

O valor alto do índice de consistência, sendo 41942 para a formulação branca e 21006 para a formulação com os extratos mostra que é um fluido consistente, característico de creme, sendo a consistência da formulação branca maior que a consistência da formulação com extrato. Tais valores mostram que a adição da associação de extratos diminui a viscosidade da emulsão.

O valor do índice de fluxo para ambas as amostras é menor que 1, sendo 0,33 para a formulação branca e 0,45 para a formulação com os extratos, mostrando assim que ambas possuem comportamento de líquido não-Newtoniano, pseudoplástico e tixotrópico.

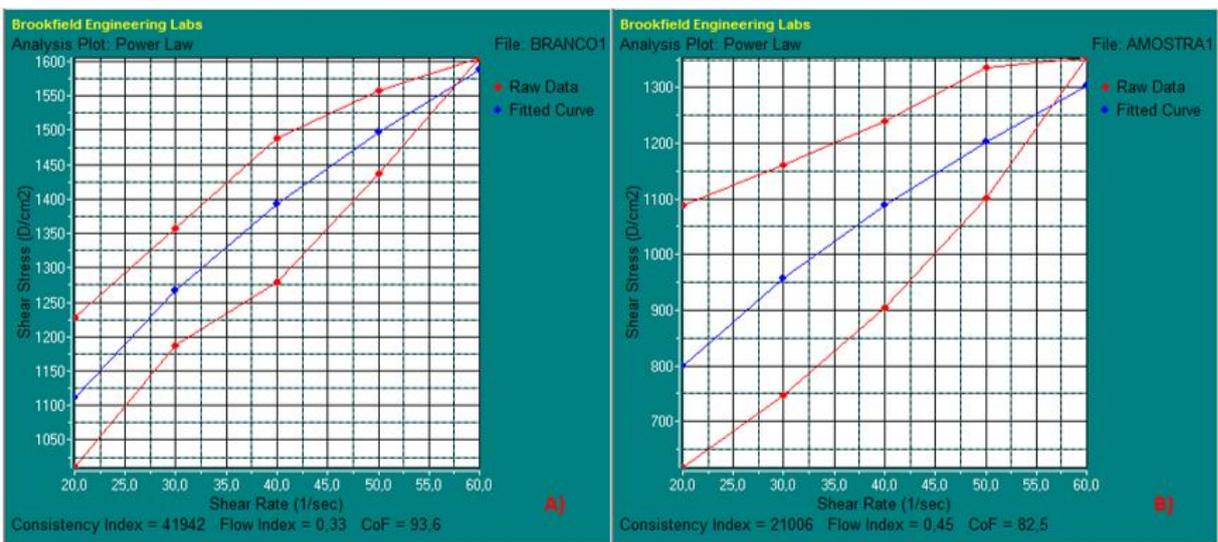


Figura 13 Avaliação reológica da emulsão

Legenda: A) Avaliação reológica da emulsão branca, sem adição dos extratos. B) Avaliação reológica da formulação com a associação dos extratos.

6. CONCLUSÃO

É possível observar a presença de compostos fenólicos e flavonóides na *Mangifera indica* e o potencial antimicrobiano para algumas espécies estudadas da mesma planta, tanto nos testes qualitativos quanto nos quantitativos.

Para *Annona crassiflora* é possível observar a presença, ainda que em baixas concentrações, de compostos fenólicos e a atividade bactericida para algumas espécies estudadas nos testes qualitativos.

A associação dos extratos age de forma diferente e não totalmente compreendida. Ao analisar a co-cultura é possível observar diferentes resultados da análise dos microrganismos separadamente, sendo necessário explorar melhor os métodos para avaliar a influência dos extratos neste parâmetro.

Assim é possível considerar o potencial das espécies em alterar a microbiota da pele e através do estudo realizado foi-se capaz de chegar ao objetivo de desenvolver uma formulação cosmética, destinada ao uso na pele da face, contudo é necessário maior estudo para se chegar na atividade prebiótica ideal.

PERSPECTIVAS

Para avaliar a propriedade prebiótica para uma microbiota complexa é necessário se aproximar mais do real através de testes em uma cultura de *swab* de pele de voluntários humanos.

Para alcançar o cosmético prebiótico ideal é necessário avaliar outras variações das concentrações dos extratos e encontrar melhores respostas para o mecanismo de atuação da associação.

A análise quantitativa de oligossacarídeos na polpa madura de *Annona crassiflora* por HPLC também será proposta, a fim de se conhecer melhor o extrato avaliado.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AIDY, S.; VAN DEN BOGERT, B.; KLEEREBEZEM, M. The small intestine microbiota, nutritional modulation and relevance for health. *Current Opinion in Biotechnology*, v. 32, p. 14–20, 2015.

AMPARO, T. R. Análise fitoquímica e bioprospecção para atividade antimicrobiana de *Protium spruceanum* (Benth.) Engler. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas). Escola de Farmácia, Universidade Federal de Ouro Preto. Ouro Preto, p. 61, 2016.

ANDRADE, L. N.; LEITE, M. G. P.; BACELLAR, L. A. P. Composição mineralógica e geoquímica dos solos do parque estadual do Itacolomi – Ouro Preto/MG. *Quaternary and Environmental Geosciences*, v. 3, n. 1-2, p. 1-8, 2012.

ANILA, L.; VIJAYALAKSHMI, N. R. Antioxidant action of flavonoids from *Mangifera indica* and *Embllica officinalis* in hypercholesterolemic rats. *Food Chemistry*, v. 83, p. 569–574, 2003.

ANITHA, R. & SUJA, A. Pharmacognosy and Phytochemical Analysis of Leaf Galls of *Mangifera Indica* L. *IJP*, v. 2, n. 6, p. 301 - 305, 2015.

ANVISA. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. *Guia Cosmético Controle De Qualidade*, 2007. Disponível em: <https://www.crq4.org.br/downloads/guia_cosmetico.pdf>.

ANVISA. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. *Guia de estabilidade de produtos cosméticos - séries temáticas*, 2004. v. 1. Disponível em: <www.anvisa.gov.br>.

ANVISA. AGENCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. Farmacopeia Brasileira, volume 1. 6ª Ed. Brasília, 2019.

ARRUDA, H. S.; PEREIRA, G. A.; PASTORE, G. M. Brazilian Cerrado fruit araticum (*Annona crassiflora* Mart.) as a potential source of natural antioxidant compounds. *International Food Research Journal*, v. 25, n. 5, p. 2005–2012, 2018.

ARRUDA, H. S. *et al.* Determination of free, esterified, glycosylated and insoluble-bound phenolics composition in the edible part of araticum fruit (*Annona crassiflora* Mart.) and its by-products by HPLC-ESI-MS/MS. *Food Chemistry*, v. 245, p. 738–749, 2018.

ARRUDA, H. S.; PASTORE, G. M. Araticum (*Annona crassiflora* Mart.) as a source of nutrients and bioactive compounds for food and non-food purposes: A comprehensive review. *Food Research International*, v. 123, p. 450–480, 2019.

ARRUDA, H. S.; PEREIRA, G. A.; PASTORE, G. M. Oligosaccharide profile in Brazilian Cerrado fruit araticum (*Annona crassiflora* Mart.). *LWT - Food Science and Technology*, v. 76, p. 278–283, 2017.

ASANO, I. *et al.* In vitro digestibility and fermentation of mannoooligosaccharides from coffee mannan. *Food Science and Technology Research*, v. 9, n. 1, p. 62–66, 2003.

AYO-OMOGIE, H. N. *et al.* Effect of ripening on some physicochemical properties of cooking banana (*Musa* ABB Cardaba) pulp and flour. *International Journal of Food Science and Technology* v. 45, p. 2605–261, 2010.

BALATO, A. *et al.* Human Microbiome: Composition and Role in Inflammatory Skin Diseases. *Archivum Immunologiae et Therapiae Experimentalis*, v. 67, n. 1, 2019.

BANCALARI, E. *et al.* Bacteriostatic or bactericidal? Impedometric measurements to test the antimicrobial activity of *Arthrospira platensis* extract. *Food Control*, v. 118, 2020.

BARRETO, J. C. B. *et al.* Characterization and Quantitation of Polyphenolic Compounds in Bark, Kernel, Leaves, and Peel of Mango (*Mangifera indica* L.) *Journal Agricultural and Food Chemistry*, p. 5599–5610, 2008.

BATOOL, N. *et al.* A mini-review of therapeutic potential of *mangifera indiica* L. *Pakistan Journal of Pharmaceutical Sciences*, v. 31, n. 4, p. 1441–1448, 2018.

BBOSA, G. S. *et al.* Antibacterial activity of *Mangifera indica* (L.). *African Journal of Ecology*, v. 45, n. 1, p. 13–16, 2007.

BELIZÓN, M. *et al.* Supercritical impregnation of antioxidant mango polyphenols into a multilayer PET/PP food-grade film. *Journal of CO2 Utilization*, v. 25, p. 56–67, 2018.

BERI, K. Perspective: Stabilizing the microbiome skin-gut-brain axis with natural plant botanical ingredients in cosmetics. *Cosmetics*, v. 5, n. 2, 2018.

BIBA, V. S. *et al.* Anticancer, antioxidant and antimicrobial activity of annonaceae family. *World Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*, v. 3, n. 3, p. 1595–1604, 2014.

BONOLI, M. *et al.* Antioxidant phenols in barley (*Hordeum vulgare* L.) flour: Comparative spectrophotometric study among extraction methods of free and bound phenolic compounds. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v. 52, n. 16, p. 5195–5200, 2004.

BOUSLIMANI, A. *et al.* Molecular cartography of the human skin surface in 3D.

Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, v. 112, n. 17, p. 2120–2129, 2015.

BRESCÓ, M. S. *et al.* Pathogenic mechanisms and host interactions in *Staphylococcus epidermidis* device-related infection. *Frontiers in Microbiology*, v. 8, 2017.

BYRD, A. L.; BELKAID, Y.; SEGRE, J. A. The human skin microbiome. *Nature Reviews Microbiology*, v. 16, n. 3, p. 143–155, 2018.

CAJADO, A. G. *et al.* Antimicrobial Effect in Vitro of Aqueous Extract and Hydroalcoholic of Sheets *Anacardium occidentale* and *Mangifera indica*. *J Health Sci*, v. 18, n. 3, p. 177-82, 2016.

CARRAZZA, T. G. *et al.* Avaliação da atividade antimicrobiana de extratos do Araticum (*Annona crassiflora* MART). *PUBVET, Londrina*, v. 5, v. 14, ed. 161, Art. 1087, 2011.

CALLEJON, S. *et al.* Respect of skin microbiome with different types of leave-on skincare products: an ecobiological approach, 2020.

CALLEWAERT, C.; HELFFER, K. R.; LEBARON, P. Skin Microbiome and its Interplay with the Environment. *American Journal of Clinical Dermatology*, v. 21, n. 1, p. 4–11, 2020.

CARDENAS, V. *et al.* Comparison of the antibacterial activity of the ethanol extract vs hydroalcoholic extract of the leaves of *mangifera indica* L. (Mango) in different concentrations: An in vitro study. *Journal of Contemporary Dental Practice*, v. 21, n. 2, p. 202–206, 2020.

CARDOSO, L. M. *Araticum, cagaita, jatobá, mangaba e pequi do Cerrado de Minas Gerais: ocorrência e conteúdo de carotenóides e vitaminas.* Dissertação de Mestrado, Programa de Pós-Graduação em Ciência da Nutrição, Universidade Federal de Viçosa. Viçosa, p. 61, 2011.

CATINEAN, A. *et al.* Microbiota and immune-mediated skin diseases—an overview. *Microorganisms*, v. 7, n. 9, p. 1–17, 2019.

CEZAR, M. *et al.* Oligosaccharide biotechnology : an approach of prebiotic revolution on the industry. *Appl Microbiol Biotechnol*, v. 102 p. 17–37, 2018.

CHANG, C. C. *et al.* Estimation of total flavonoid content in propolis by two

complementary colometric methods. *Journal of Food and Drug Analysis*, v. 10, n. 3, p. 178–182, 2002.

CLERICI, M. T. P. S.; CARVALHO-SILVA, L. B. Nutritional bioactive compounds and technological aspects of minor fruits grown in Brazil. *Food Research International*, v. 44, n. 7, p. 1658–1670, 2011.

CLSI. *Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria That Grow Aerobically; Approved Standard* —ed. 9, v. 32, 2012.

COMAN, M. M. *et al.* Polyphenol content and in vitro evaluation of antioxidant, antimicrobial and prebiotic properties of red fruit extracts. *European Food Research and Technology*, v. 244, n. 4, p. 735–745, 2017.

CONG, J.; ZHANG, X. How human microbiome talks to health and disease. *European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases*, v. 37, n. 9, p. 1595–1601, 2018.

DA SILVA, E. P.; VILAS BOAS, E. V. B.; XISTO, A. L. P. R. Characterization and development of marolo (*Annona crassiflora*, Mart.). *Food Science and Technology*, v. 33, n. 4, p. 666–675, 2013.

DA SILVA, J. *et al.* Triagem in vitro da atividade antibacteriana de *Bidens pilosa* Linné e *Annona crassiflora* mart. contra *Staphylococcus aureus* resistente à oxacilina (ORSA) provenientes do ambiente aéreo na clínica odontológica. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de Sao Paulo*, v. 56, n. 4, p. 333–340, 2014.

DAGNELIE, M. A. *et al.* Inflammatory skin is associated with changes in the skin microbiota composition on the back of severe acne patients. *Experimental Dermatology*, v. 28, n. 8, p. 961–967, 2019.

DE MORAES, M. R. *et al.* Bioactivity of atemoya fruits and by-products. *Food Bioscience*, v. 41, 2021.

DENAMUR, E. *et al.* The population genetics of pathogenic *Escherichia coli*. *Nature Reviews Microbiology*, v. 19, n. 1, p. 37–54, 2021.

DERESE, S. *et al.* *Mangifera indica* L. (*Anacardiaceae*). *Elsevier Inc.*, 2017.

DI LODOVICO, S. *et al.* Prebiotic combinations effects on the colonization of staphylococcal skin strains. *Microorganisms*, v. 9, n. 1, p. 1–15, 2021.

DOUGHARI, J. H. & MANZARA, S. In vitro antibacterial activity of crude leaf extracts of *Mangifera indica* Linn. *African Journal of Microbiology Research*, v. 2, p. 067-072, 2008.

DUDA-CHODAK, A. *et al.* Interaction of dietary compounds, especially polyphenols, with the intestinal microbiota: a review. *European Journal of Nutrition*, v. 54, n. 3, p. 325–341, 2015.

ERIN CHEN, Y.; FISCHBACH, M. A.; BELKAID, Y. Skin microbiota-host interactions. *Nature*, 2018.

GARCIA, M. *et al.* *Pseudomonas aeruginosa* flagellum is critical for invasion, cutaneous persistence and induction of inflammatory response of skin epidermis. *Virulence*, v. 9, n. 1, p. 1163–1175, 2018.

GOBBO-NETO, L.; LOPES, N. P. Plantas medicinais: Fatores de influência no conteúdo de metabólitos secundários. *Química Nova*, v. 30, n. 2, p. 374–381, 2007.

GOMES, A. *et al.* Efeito Antimicrobiano in Vitro do Extrato Aquoso e Hidroalcoólico das Folhas de *Anacardium occidentale* e *Mangifera indica*, *J Health Sci*, v. 18, n. 3, p. 177–182, 2016.

GOMES, C. F.; GOMES, J. H. e SILVA, E. F. DA. Bacteriostatic and bactericidal clays: an overview. *Environ Geochem Health*, v. 42, p. 3507–3527, 2020.

GRICE, E. A. *et al.* A diversity profile of the human skin microbiota. *Genome Research*, v. 18, n. 7, p. 1043–1050, 2008.

GUARNER, F. *et al.* Diretriz mundial da WGO - Probióticos e prebióticos. *World Gastroenterology Organisation*, p. 35, 2017.

HASPERUÉ, J. H. *et al.* Use of LED light for Brussels sprouts postharvest conservation. *Scientia Horticulturae*, v. 213, n. 1974, p. 281–286, 2016.

HERMAN, A.; HERMAN, A. P. Antimicrobial peptides activity in the skin. *Skin Research and Technology*, v. 25, n. 2, p. 111–117, 2019.

HONG, K. B. *et al.* Changes in the diversity of human skin microbiota to cosmetic serum containing prebiotics: Results from a randomized controlled trial. *Journal of Personalized Medicine*, v. 10, n. 3, p. 1–14, 2020.

JOVANOVIC-MALINOVSKA, R.; KUZMANOVA, S.; WINKELHAUSEN, E.

Application of ultrasound for enhanced extraction of prebiotic oligosaccharides from selected fruits and vegetables. *Ultrasonics Sonochemistry*, v. 22, p. 446–453, 2015.

KANWAL, Q. *et al.* Antifungal activity of flavonoids isolated from mango (*Mangifera indica* L.) leaves. *Natural Product Research*, v. 24, n. 20, p. 1907–1914, 2010.

KENNY, C. R.; FUREY, A.; LUCEY, B. A post-antibiotic era looms: Can plant natural product research fill the void? *British Journal of Biomedical Science*, v. 72, n. 4, p. 191–200, 2015.

KNACKSTEDT, R.; KNACKSTEDT, T.; GATHERWRIGHT, J. The role of topical probiotics in skin conditions: A systematic review of animal and human studies and implications for future therapies. *Experimental Dermatology*, v. 29, n. 1, p. 15–21, 2020.

KORKINA, L.; DE LUCA, C.; PASTORE, S. Plant polyphenols and human skin: Friends or foes. *Annals of the New York Academy of Sciences*, v. 1259, n. 1, p. 77–86, 2012.

KUMAR, M. *et al.* Mango (*Mangifera indica* L.) leaves: Nutritional composition, phytochemical profile, and health-promoting bioactivities. *Antioxidants*, v. 10, n. 2, p. 1–23, 2021.

LATREILLE, B., & PAQUIN, P. Evaluation of Emulsion Stability by Centrifugation with Conductivity Measurements. *Journal of Food Science*, v. 55, n. 6, p. 1666–1668, 1990.

LEHTIMÄKI, J. *et al.* Patterns in the skin microbiota differ in children and teenagers between rural and urban environments. *Scientific Reports*, v. 7, 2017.

LENGTH, F. In vitro antibacterial activity of crude leaf extracts of *Mangifera indica* Linn. *African Journal of Microbiology Research*, v. 2, n. 4, p. 67–72, 2008.

LEOTY-OKOMBI, S. *et al.* Effect of Sodium Lauryl Sulfate (SLS) Applied as a Patch on Human Skin Physiology and Its Microbiota. *Cosmetics*, v. 8, n. 6, p. 1–12, 2021.

LOLOU, V.; PANAYIOTIDIS, M. I. Functional role of probiotics and prebiotics on skin health and disease. *Fermentation*, v. 5, n. 2, 2019.

MACÊDO, S. K. S.; LIMA, K. S. B.; NETO, P. J. R.; ROLIM, L. A.; NUNES, X. P. Caracterização farmacognóstica, térmica e morfológica das cascas e folhas de *Triplaris gardneriana* Weed. *Brazilian Journal of Development*, v. 6, n. 3, p. 11904-11915, 2020.

MAGALHÃES, L. M. *et al.* Automatic Aluminum Chloride Method for Routine Estimation of Total Flavonoids in Red Wines and Teas. *Food Analytical Methods*, v. 5, n. 3,

p. 530–539, 2012.

MAGUIRE, M.; MAGUIRE, G. The role of microbiota, and probiotics and prebiotics in skin health. *Archives of Dermatological Research*, v. 309, n. 6, p. 411–421, 2017.

MAHDI POUR, B., LATHA, L. Y. e SASIDHARAN, S. Cytotoxicity and Oral Acute Toxicity Studies of Lantana camara Leaf Extract. *Molecules*, v. 16, p. 3663-3674, 2011.

MARKOWIAK, P., ŚLIŻEWSKA, K. Effects of Probiotics, Prebiotics, and Synbiotics on Human Health. *Nutrients*, v. 9, n. 9, 2017. 21.

MASIBO, M.; QIAN, H. Major mango polyphenols and their potential significance to human health. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, v. 7, n. 4, p. 309–319, 2008.

MOORTHY, M. *et al.* Prebiotic potential of polyphenols, its effect on gut microbiota and anthropometric/clinical markers: A systematic review of randomised controlled trials. *Trends in Food Science and Technology*, v. 99, p. 634–649, 2020.

MOORTHY, M.; SUNDRALINGAM, U.; PALANISAMY, U. D. Polyphenols as prebiotics in the management of high-fat diet-induced obesity: A systematic review of animal studies. *Foods*, v. 10, n. 299, p. 1-34, 2021.

MURILLO, N.; RAOULT, D. Skin microbiota: Overview and role in the skin diseases acne vulgaris and rosacea. *Future Microbiology*, v. 8, n. 2, p. 209–222, 2013.

MUSCI, M.; YAO, S. Optimization and validation of Folin–Ciocalteu method for the determination of total polyphenol content of Pu-erh tea. *International Journal of Food Sciences and Nutrition*, v. 68, n. 8, p. 913–918, 2017.

NADAL, M. D. C.; KANUNFRE, C. C. Avaliação da citotoxicidade da fase vapor do óleo essencial de *Pogostemon cablin* Benth em células A549. *Encontro Anual de Iniciação Científica*, 2019.

NAKATSUJI, T. *et al.* Antimicrobials from human skin commensal bacteria protect against *Staphylococcus aureus* and are deficient in atopic dermatitis. *Science Translational Medicine*, v. 9, n. 378, p. 1–12, 2017.

NOOR, S. A. *et al.* Erythroxyllum cuneatum Prevented Cellular Adaptation in Morphineinduced Neuroblastoma Cells. *Central Nervous System Agents in Medicinal Chemistre*, v. 22, n. 2, p. 108 - 117, 2022.

NOTAY, M. *et al.* Probiotics, Prebiotics, and Synbiotics for the Treatment and Prevention of Adult Dermatological Diseases. *American Journal of Clinical Dermatology*, v. 18, n. 6, p. 721–732, 2017.

OKUNJI, C. *et al.* An antifungal spirostanol saponin from fruit pulp of dracaena mannii. *Pharmaceutical Biology*, v. 28, n. 3, p. 193–199, 1990.

Ó-MARQUES, J. *et al.* Changes in grape seed, skin and pulp condensed tannins during berry ripening: effect on fruit pruning. *Ciência. Tec. Vitiv*, v. 20, n. 1, p. 35-52, 2005.

OSTROSKY, E. A. *et al.* Métodos para avaliação da atividade antimicrobiana e determinação da Concentração Mínima Inibitória (CMI) de plantas medicinais. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, v. 18, n. 2, p. 301–307, 2008.

OTI WILBERFORCE, J.O.; NKECHINYERE OLIVIA, E. I. Phytochemical Screening and Antimicrobial Activity of Leaves Extracts of Mangifera indica and Carica papaya. *International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences*, v. 6, n. 8, p. 3253–3259, 2017.

PAL, R. Rheology of simple and multiple emulsions. *Current Opinion in Colloid & Interface Science*, v. 16, n. 1, p. 41-60, 2011.

PAN, J. *et al.* Bioactive phenolics from mango leaves (Mangifera indica L.). *Industrial Crops and Products*, v. 111, p. 400–406, 2018.

PARLET, C. P.; BROWN, M. M.; HORSWILL, A. R. Commensal Staphylococci Influence Staphylococcus aureus Skin Colonization and Disease. *Trends in Microbiology*, v. 27, n. 6, p. 497–507, 2019.

PATEL, S.; GOYAL, A. Functional oligosaccharides: Production, properties and applications. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, v. 27, n. 5, p. 1119–1128, 2011.

PEREZ, D.M.; MAIER, J.C.; BRUM, P.A.R.; MARTINS, C.S.; GOMES, P.C. Determinação do Teor de Tanino de Quatro Variedades de Sorgo por Intermédio de Métodos Quantitativos. *Revista brasileira de zootecnia*, v. 28, n. 3, p. 453-458, 1999.

PESSEMIER, B. D. *et al.* Gut–skin axis: Current knowledge of the interrelationship between microbial dysbiosis and skin conditions. *Microorganisms*, v. 9, n. 2, p. 1–33, 2021.

PFALZGRAFF, A.; BRANDENBURG, K.; WEINDL, G. Antimicrobial peptides and

their therapeutic potential for bacterial skin infections and wounds. *Frontiers in Pharmacology*, v. 9, p. 1–23, 2018.

PIERRI, E. G.; CASTRO, R. C.; VIZIOLI, E. O.; FERREIRA, C. M.R.; CAVALHEIRO, A. J.; TININIS, A. G.; CHIN, C. M.; SANTOS, G. Anti-inflammatory action of ethanolic extract and clerodane diterpenes from *Casearia sylvestris*. **Brazilian Journal of Pharmacognosy**, v. 27, p. 495-501, 2017.

PIRES, J. S.; TORRES, P. B.; SANTOS, D. Y. A. C.; CHOW, F. Ensaio em microplaca de substâncias redutoras pelo método do Folin-Ciocalteu para extratos de algas. *Instituto de Biociências, Universidade de São Paulo*, p. 1 – 5, 2017

POPOV, L. *et al.* Three-dimensional human skin models to understand *Staphylococcus aureus* skin colonization and infection. *Frontiers in Immunology*, v. 5, p. 1–7, 2014.

PRADO, L. G. *et al.* Antioxidant, antiproliferative and healing properties of araticum (*Annona crassiflora* Mart.) peel and seed. *Food Research International*, v. 133, p. 109-168, 2020.

PRESCOTT, S. L. *et al.* The skin microbiome: Impact of modern environments on skin ecology, barrier integrity, and systemic immune programming. *World Allergy Organization Journal*, 2017.

RAKHOLIYA, K. & CHANDA, S. Pharmacognostic, Physicochemical and Phytochemical Investigation of *Mangifera indica* L. var. Kesar leaf. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*, v.6, p. 80 - 84, 2012.

RATZ-YKO, A. *et al.* Influence of polyphenols on the physiological processes in the skin. *Phytotherapy Research*, v. 29, n. 4, p. 509–517, 2015.

ROCHA, M. A.; BAGATIN, E. Skin barrier and microbiome in acne. *Archives of Dermatological Research*, v. 310, n. 3, p. 181–185, 2018.

RODRÍGUEZ-DAZA, M. C. *et al.* Polyphenol-Mediated Gut Microbiota Modulation: Toward Prebiotics and Further. *Frontiers in Nutrition*, v. 8, 2021.

ROSENBERG, E. e ZILBER-ROSENBERG, I. Symbiosis and Development: The Hologenome Concept. *Birth Defects Research (Part C)*, v. 9, p. 56–66, 2011.

SALEM, I. *et al.* The gut microbiome as a major regulator of the gut-skin axis.

Frontiers in Microbiology, v. 9, p. 1–14, 2018.

SAMANTA, S. et al. Anti-diabetic activity of mango (*Mangifera indica*): a review. *MOJ Bioequiv Availab*, v. 6, n. 2, p. 23–26, 2019.

SANTOS, V. A. Estudo fitoquímico e atividade antioxidante do extrato e frações das folhas de *Humulus lupulus* L. (Cannabaceae). Orientadora: Regislainy Gomes da Silva. 2018. 60 f. TCC (Graduação) – Curso de Farmácia, Curso de Farmácia, Universidade Federal de Ouro Preto, Ouro Preto, 2018.

SHAPIRA, M. Gut Microbiotas and Host Evolution: Scaling Up Symbiosis. *Trends in Ecology & Evolution*, v. 31, n. 7, p. 539 - 549, 2016.

SCHOMMER, N. N.; GALLO, R. L. Structure and function of the human skin microbiome. *Trends in Microbiology*, v. 21, n. 12, p. 660–668, 2013.

SEVERI, J. A. et al. Polyphenols with antiulcerogenic action from aqueous decoction of mango leaves (*Mangifera indica* L.). *Molecules*, v. 14, n. 3, p. 1098–1110, 2009.

SFRISO, R.; CLAYPOOL, J. Microbial reference frames reveal distinct shifts in the skin microbiota after cleansing. *Microorganisms*, v. 8, n. 11, p. 1–16, 2020.

SHARMA DHITAL, K. et al. Phytochemical screening and antioxidant activities of *Mangifera indica* leaves grown in temperate region of the Nepal. *Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry*, v. 6, n. 3, p. 205–209, 2017.

SHRAIM, A. M. et al. Determination of total flavonoid content by aluminum chloride assay: A critical evaluation. *Lwt*, v. 150, 2021.

SINHA, S.; LIN, G.; FERENCZI, K. The skin microbiome and the gut-skin axis. *Clinics in Dermatology*, v. 39, n. 5, p. 829–839, 2021.

SKEHAN, P.; STORENG, R.; SCUDIERO, D.; MONKS, A.; MCMAHON, J.; VISTICA, D.; WARREN, J.T.; BOKESCH, H.; KENNEY, S.; BOYD, M.R. New colorimetric cytotoxicity assay for anticancer-drug screening. **Journal of National Cancer Institute**, 82 (13), 1107-1112, 1990.

SMITH, A. L., & MITCHELL, D. P. The Centrifuge Technique in the Study of Emulsion Stability. *Theory and Practice of Emulsion Technology*, p. 61–74, 1976.

SORREL, J. M. e CAPLAN, A. I. Fibroblast heterogeneity: more than skin deep. *J*

Cell Sci, v. 117, n. 5, p. 667–675, 2004.

TAHERI, A. et al. Antibacterial Effect of *Myrtus Communis* Hydro-Alcoholic Extract on Pathogenic Bacteria. *Zahedan J Res Med Sci*, v. 15, n. 6, p. 19-24, 2013.

THAMMARUTWASIK, P. et al. Prebiotics – A Review. *Songklanakarin J. Sci. Technol.* v. 31, n. 4, p. 401–408, 2009.

THILAKARATHNA, W. W.; LANGILLE, M. G.; RUPASINGHE, H. V. Polyphenol-based prebiotics and synbiotics: potential for cancer chemoprevention. *Current Opinion in Food Science*, v. 20, p. 51–57, 2018.

TOLEDO, R. C. L. et al. Acute treatment with: *Mangifera indica* L. leaf extract attenuates liver inflammation in rats fed a cafeteria diet. *Food and Function*, v. 10, n. 8, p. 4861–4867, 2019.

TRACY, L. E., MINASIAN, R. A., & CATERSON, E. J. Extracellular Matrix and Dermal Fibroblast Function in the Healing Wound. *Advances in Wound Care*, v. 5, n. 3, p. 119–136, 2016.

TRINH, P. et al. One Health Relationships Between Human, Animal, and Environmental Microbiomes: A Mini-Review. *Frontiers in Public Health*, v. 6, p. 1–9, 2018.

WALKER, A. W. Studying the Human Microbiota. *Advances in Experimental Medicine and Biology*, v. 902, p. 5–32, 2016.

WERKMAN, C. Citotoxicidade da *Punica granatum* L. (Romã) sobre cultura de fibroblastos e células de linhagem cancerígena. São José dos Campos, 2009, 115 p. Tese (Doutorado em Biopatologia Bucal), Faculdade de Odontologia, Universidade Estadual Paulista.

WHO. Métodos de controle de qualidade de plantas medicinais. Geneva. 2002; pg. 28-31.

WILSON, A. S. et al. Diet and the Human Gut Microbiome: An International Review. *Digestive Diseases and Sciences*, v. 65, n. 3, p. 723–740, 2020.

WU, D. C. et al. *Pseudomonas* skin infection: Clinical features, epidemiology, and management. *American Journal of Clinical Dermatology*, v. 12, n. 3, p. 157–169, 2011.

YAMAZAKI, Y.; NAKAMURA, Y.; NÚÑEZ, G. Role of the microbiota in skin immunity and atopic dermatitis. *Allergology International*, v. 66, n. 4, p. 539–544, 2017.