



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

DAIANE DE JESUS

**ATIVIDADE ANTIMICROBIANA, ANTI-INFLAMATÓRIA,
CITOTOXICIDADE E GENOTOXICIDADE DO EXTRATO
GLICÓLICO DE *Betula pendula* Roth (BÉTULA)**

2016

DAIANE DE JESUS

**ATIVIDADE ANTIMICROBIANA, ANTI-INFLAMATÓRIA,
CITOTOXICIDADE E GENOTOXICIDADE DO EXTRATO GLICÓLICO
DE *Betula pendula* Roth (BÉTULA)**

Dissertação apresentada ao curso de Odontologia do Instituto de Ciências e Tecnologia, UNESP – Univ Estadual Paulista, Campus de São José dos Campos, como parte dos requisitos para obtenção do título de MESTRE, pelo Programa de Pós-Graduação em BIOPATOLOGIA BUCAL, Área Microbiologia / Imunologia.

Orientadora: Profa. Dra. Luciane Dias de Oliveira

São José dos Campos
2016

Apresentação gráfica e normatização de acordo com:
Alvarez S, Coelho DCAG, Couto RAO, Durante APM. Guia prático para
Normalização de Trabalhos Acadêmicos do ICT. Rev. São José dos
Campos: ICT/UNESP; 2016.

Jesus, Daiane de

Atividade antimicrobiana, anti-inflamatória, citotoxicidade e
genotoxicidade do extrato glicólico de *Betula pendula* Roth (bétula)
/ Daiane de Jesus. - São José dos Campos : [s.n.], 2016.
80 f. : il.

Dissertação (Mestrado em Biopatologia Bucal) - Pós-graduação em
Biopatologia Bucal - Instituto de Ciência e Tecnologia de São José
dos Campos, UNESP - Univ Estadual Paulista, 2016.

Orientador: Luciane Dias de Oliveira.

1. Extratos vegetais. 2. *Betula*. 3. Ação antimicrobiana. 4. Anti-
inflamatórios. 5. Citotoxicidade Imunológica. I. Dias de Oliveira,
Luciane , orient. II. Instituto de Ciência e Tecnologia de São José
dos Campos, UNESP - Univ Estadual Paulista. III. Universidade
Estadual Paulista 'Júlio de Mesquita Filho'. IV. UNESP - Univ
Estadual Paulista. V. Título.

Ficha catalográfica elaborada pela Biblioteca Prof. Achille Bassi e Seção Técnica de Informática,
ICMC/USP com adaptações - STATi e STI do ICT/UNESP. Dados fornecidos pelo autor.

AUTORIZAÇÃO

Autorizo a reprodução e divulgação total ou parcial deste trabalho, por qualquer
meio convencional ou eletrônico, desde que citada a fonte.

São José dos Campos, 26 de fevereiro de 2016
E-mail: daianej1@gmail.com

Assinatura: _____

BANCA EXAMINADORA

Profa. Dra. Luciane Dias de Oliveira (Orientadora)

Instituto de Ciências e Tecnologia
UNESP – Univ Estadual Paulista
Campus de São José dos Campos

Prof. Tit. Antonio Olavo Cardoso Jorge

Instituto de Ciências e Tecnologia
UNESP – Univ Estadual Paulista
Campus de São José dos Campos

Profa. Dr. Marcos Roberto Furlan

Departamento de Ciências Agrárias
UNITAU – Universidade de Taubaté
Campus de Taubaté

São José dos Campos, 26 de fevereiro de 2016.

DEDICATÓRIA

*A Deus,
A minha mãe (in memoriam)
Ao meu pai
As minhas irmãs
Ao meu noivo*

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus por me providenciar esta oportunidade e novo rumo na minha vida profissional e por me dar saúde, força e sabedoria para ser capaz de cumprir esta missão.

Aos meus pais Antonio de Jesus e Maria Aparecida Alves de Jesus (in memoriam) pelo amor, suporte e pela boa educação e criação que me deram.

Agradeço as minhas irmãs Viviane Aparecida de Jesus e Vanessa de Jesus pelo carinho e incentivo aos meus estudos.

Ao meu noivo Milton Fernando Viegas Júnior pelo amor, compreensão e apoio.

Ao Instituto de Ciências e Tecnologia ICT da Unesp de São José dos Campos por oferecer o Programa de Pós-Graduação em Biopatologia Bucal de excelente qualidade.

A minha querida orientadora Professora Dra. Luciane Dias de Oliveira por ter me aceitado como orientanda, por todo apoio, ajuda e suporte técnico, moral e financeiro para concretizar o projeto do meu mestrado. Pela amizade, carinho e confiança no meu trabalho e pelos incentivos em participar dos eventos acadêmicos. Lu você é um exemplo de pessoa e profissional, te admiro muito! Obrigada por tudo!

A todos os professores do Programa de Biopatologia Bucal do ICT/ UNESP, em especial ao Professor Titular Dr. Antonio Olavo Cardoso Jorge e à Professora Adjunta Dra. Juliana Campos Junqueira pela dedicação e esforço em busca de melhorias para os alunos e para o Programa e pelo empenho com qual lecionam os créditos de Microbiologia e Imunologia tão importantes para nossa formação, aprendi muito com vocês.

A todos os meus amigos de pós-graduação pelo convívio harmonioso e amigável. Pelos conselhos, apoio moral e técnico, dicas, ajuda em diversos aspectos, pelas conversas, encontros e “comes e bebes” que fizeram esses dois anos passar muito rápido e de forma muito agradável.

Aos meus queridos amigos Jonatas Rafael de Oliveira e Isabela Amêndola que foram meus parceiros nesta minha trajetória de mestrado. O Jonatas é meu consultor de assuntos acadêmicos, com muita paciência, cuidado e dedicação me ensinou todas as técnicas que utilizaria no meu projeto e me deu muitas dicas de como escrever resumos, trabalhos e artigos e me incentivou a participar dos encontros acadêmicos. A Isa não mediu esforços para me ajudar, principalmente nos inúmeros biofilmes que fizemos durante o mestrado. Sempre otimista e simples, com uma boa conversa e carinhosa. Meu mestrado não seria completo sem vocês, muito obrigada!

A todos os funcionários que nos ajudam em diversos assuntos e facilitam nossas vidas, em especial aos técnicos de laboratórios Domingos e Sérgio e à secretária Vanessa.

E à Capes pela concessão da Bolsa de Mestrado.

"Deus quer, o homem sonha, a obra nasce".
Fernando Pessoa

SUMÁRIO

RESUMO	9
ABSTRACT	10
1 INTRODUÇÃO	11
2 REVISÃO DA LITERATURA	14
2.1 <i>Betula pendula</i> Roth (Bétula)	14
2.2 Micro-organismos alvos da pesquisa	16
2.2.1 Leveduras do gênero <i>Candida</i>	16
2.2.2 Bactérias	19
2.3 Avaliação das atividades antimicrobiana e anti-inflamatória de extratos vegetais	22
3 PROPOSIÇÃO	27
4 MATERIAL E MÉTODOS	28
4.1 Avaliação da atividade antimicrobiana	28
4.1.1 Determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM) e Concentração Microbicida Mínima (CMM)	27
4.1.2 Avaliação da atividade antimicrobiana do extrato em biofilmes	30
4.2 Avaliação da citotoxicidade	33
4.2.1 Análise da viabilidade celular pelo teste MTT	34
4.2.2 Ensaio de citotoxicidade pela produção de citocinas IL-1 β e TNF- α por macrófagos	36
4.2.2.1 Ensaio imunoenzimático ELISA	37
4.3 Avaliação da genotoxicidade (teste de micronúcleos)	38
4.4 Avaliação da atividade anti-inflamatória	39
4.5 Análise estatística	41

5 RESULTADOS	42
5.1 Atividade antimicrobiana	42
5.1.1 Culturas planctônicas.....	42
5.1.2 Biofilmes	44
5.2 Citotoxicidade	48
5.3 Genotoxicidade	52
5.4 Atividade anti-inflamatória	53
6 DISCUSSÃO	58
7 CONCLUSÃO	67
8 REFERÊNCIAS	68
ANEXO	80

Jesus D. Atividade antimicrobiana, anti-inflamatória, citotoxicidade e genotoxicidade do extrato glicólico de *Betula pendula* Roth (bétula) [dissertação]. São José dos Campos (SP): Instituto de Ciência e Tecnologia, UNESP – Univ Estadual Paulista; 2016.

RESUMO

Visando o potencial terapêutico do extrato glicólico de *B. pendula* em tratamentos de infecções bacterianas e fúngicas e de doenças inflamatórias, foram avaliadas suas atividades antimicrobiana, anti-inflamatória, citotóxica e genotóxica. A atividade antimicrobiana do extrato foi analisada em *Candida albicans*, *C. dubliniensis*, *C. glabrata*, *C. guilliermondii*, *C. krusei*, *C. tropicalis*, *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus mutans*, *Escherichia coli* e *Pseudomonas aeruginosa* com a determinação das Concentrações Inibitória Mínima e Microbicida Mínima (CIM e CMM) em culturas planctônicas e posteriormente testado sobre biofilmes monotípicos. A atividade citotóxica foi avaliada em cultura de macrófagos de camundongo (RAW 264.7) e fibroblastos gengivais humanos (FMM-1) após exposição de 5 min e 24 h ao extrato, com o teste MTT e teste imunoenzimático (ELISA) que quantificou a produção das citocinas IL-1 β e TNF- α produzidas por RAW 264.7. A genotoxicidade do extrato foi avaliada pelo teste de micronúcleos. A atividade anti-inflamatória foi avaliada nos sobrenadantes coletados de culturas de RAW 264.7 estimuladas com LPS de *E. coli* e expostas aos extratos (5 min e 24 h) pela quantificação de citocinas IL-1 β , TNF- α e IL-10 por ELISA e óxido nítrico (ON) pelo método de Griess. A análise estatística foi realizada por ANOVA e teste de Tukey, com significância de 5%. O extrato teve ação antimicrobiana em todos biofilmes, com redução acima de 39,5% em 5 min e acima de 78% em 24 h. A viabilidade celular foi satisfatória em concentrações abaixo de 50 mg/mL em 5 min tanto para FMM-1, quanto para RAW 264.7, contudo em 24 h concentrações acima de 3,13 e 12,5 mg/mL foram citotóxicas para RAW 264.7 e FMM-1, respectivamente. Não houve indícios de ação genotóxica do extrato. A atividade anti-inflamatória foi evidenciada pela redução significativa na produção de TNF- α e ON nos grupos tratados. Conclui-se que o extrato de bétula tem potencial como agente antimicrobiano e anti-inflamatório.

Palavras-chave: Extratos vegetais. Betula. Ação antimicrobiana. Anti-inflamatórios. Citotoxicidade Imunológica. Genotoxicidade.

Jesus D. *Antimicrobial and anti-inflammatory activity, cytotoxicity and genotoxicity of Betula pendula Roth (Birch) glycolic extract [dissertation]. São José dos Campos (SP): Institute of Science and Technology, UNESP – Univ Estadual Paulista; 2016.*

ABSTRACT

In order to verify the therapeutic potential of glycolic extract of B. pendula on the treatment of bacterial and fungal infection and on inflammatory diseases, its antimicrobial, anti-inflammatory actions, cytotoxic and genotoxic effects were evaluated. The antimicrobial activity of the extracts was tested on Candida albicans, C. dubliniensis, C. glabrata, C. guilliermondii, C. krusei, C. tropicalis, Staphylococcus aureus, Streptococcus mutans, Escherichia coli and Pseudomonas aeruginosa with determination of Minimum Inhibitory and Minimum Microbicide Concentrations (MIC and MMC) in planktonic growth, following of test in monotypic biofilms. The cytotoxic activity was evaluated in mouse macrophages (RAW 264.7) and human gingival fibroblast (FMM-1) after exposure of 5 min and 24 h to extract, through the MTT test and by Enzyme Linked Immunosorbent Assay (ELISA) to quantify the production of the cytokines IL-1 β and TNF- α by RAW 264.7. The genotoxicity of the extracts was evaluated by micronucleus test. The anti-inflammatory activity was evaluated in RAW 264.7 stimulated with LPS from E. coli, after the period of exposure to the extract (5 min and 24 h) the supernatant was removed to quantify pro-inflammatory (IL-1 β and TNF- α .) and anti-inflammatory (IL-10) cytokines by ELISA and nitric oxide (NO) by Griess method. Statistical analysis was performed by ANOVA and Tukey's test, with significance level of 5%. The extract has shown antimicrobial activity with reduction above of 39.5% of biofilm in 5 min and more than 78% in 24 h. The cell viability was satisfactory at concentrations below 50 mg/mL in 5 min to RAW 264.7 and FMM-1, however in 24 h concentrations above 3.13 and 12.5 mg/mL were cytotoxic to RAW 264.7 and FMM-1, respectively. There was no evidence of genotoxic action of the extract. The anti-inflammatory activity was evidenced by the significant reduction in the production of TNF- α and NO in the treated groups. It concludes that the birch extract has potential as antimicrobial and anti-inflammatory agent.

Keywords: *Plant extracts. Betula. Anti-infective Agents. Anti-inflammatory agents. Cytotoxicity, Immunologic. Genotoxicity.*

1 INTRODUÇÃO

As plantas, desde muito tempo, apresentam fontes de tratamento e cura para diversas doenças. O uso de planta medicinal está intimamente associado à história da humanidade. Atualmente as plantas medicinais ainda são largamente utilizadas como uma alternativa para o tratamento de inúmeras doenças, principalmente onde os recursos médicos são precários ou ausentes. Espécies vegetais com ação terapêutica, utilizadas para fins profiláticos, curativos ou paliativos, podem dar origem à produção de fitoterápicos. De acordo com a legislação sanitária brasileira (Brasil, 2004), os fitoterápicos são medicamentos manufaturados cujos princípios ativos são exclusivamente oriundos de derivados vegetais, tais como, extrato, tintura, óleo, suco e cera, sendo obtidos por técnicas adequadas.

A Organização Mundial da Saúde (OMS) reconhece que grande parte da população, aproximadamente 80%, em países em desenvolvimento utilizam plantas medicinais para tratamentos primários, porém recomenda-se que sejam realizados estudos científicos para comprovação de sua eficácia (Brasil, 2006). Muitos extratos de plantas apresentam diversas finalidades terapêuticas, com grandes potenciais para elaboração de novos fármacos. Contudo, é necessária a realização de estudos científicos para comprovação da eficácia dessas plantas diante às inúmeras atividades farmacológicas que podem apresentar, como ações antimicrobianas e anti-inflamatória, buscando assegurar que não sejam tóxicas ao organismo.

Betula pendula Roth pertence à família Betulaceae. É conhecida popularmente por bétula. É uma árvore nativa de climas temperados na Europa e norte da Ásia (Rastogi et al., 2015) e

amplamente utilizada como planta medicinal no tratamento de reumatismos e disfunções renais (Havlik et al., 2010), doenças bacterianas e inflamatórias, queda de cabelo e seborreia (Menkovic et al., 2011). Alguns estudos relataram sua ação anti-inflamatória (Wacker et al., 2012), anticancerígena (Gründemann et al., 2011) e antimicrobiana (Wojnicz et al., 2012).

Os micro-organismos avaliados no presente estudo são todos de importância médica e odontológica. As espécies de *Candida* embora comensais, podem ser patógeno-oportunistas em caso de baixa imunidade do hospedeiro, causando-lhe infecções, denominadas candidoses (Rodrigues et al., 2014).

Escherichia coli e *Pseudomonas aeruginosa* podem causar infecções graves e quadros de bacteriemia, além de ter a capacidade de desenvolver resistência a antibióticos (Anes et al., 2015; Hu et al., 2015). *Staphylococcus aureus* está relacionado à infecção alimentar e hospitalar (Espina et al., 2015), com crescente aumento de cepas resistentes à metilina (Gerber et al., 2009). *Streptococcus mutans* é um dos agentes causadores da cárie dentária (Hasan et al., 2015).

Estudos sobre métodos alternativos, como uso de extratos vegetais, para o controle de micro-organismos, são de grande relevância, uma vez que um dos grandes problemas na área da saúde é o aumento da resistência de micro-organismos aos antibióticos utilizados no tratamento de infecções, como os β -lactâmicos, aminoglicosídeos e quinolonas (Al-Dhabi et al., 2015). Micro-organismos resistentes a antibióticos podem provocar doenças infecciosas de difícil tratamento e alto índice de mortalidade (Namita, Mukesh, 2012).

Desta forma, estudos envolvendo extratos vegetais representam importante campo de pesquisa, pois podem trazer diversos benefícios às áreas da saúde, inclusive na odontologia. Com isso, torna-se de interesse avaliar as atividades biológicas da bétula visando seu uso terapêutico e inserção em formulações de uso médico-odontológico, tais

como medicações, irrigantes intracanaais, enxaguatórios bucais, dentifrícios, entre outros.

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 *Betula pendula* Roth (Bétula)

Betula pendula é uma espécie do gênero *Betula* comum em regiões de clima temperado, nativa do leste Europeu e norte asiático. Raramente é encontrada em regiões tropicais, como o Brasil. É amplamente utilizada na medicina popular no tratamento de doenças de pele, infecções severas, inflamações e desordens urinárias (Demirci et al., 2004).

Diante do uso de *B. pendula* como planta medicinal, estudos tem sido direcionados a avaliar suas atividades biológicas, muitas vezes encontrando resultados que apoiam alguns de seus usos populares. Wojnicz et al. (2012) avaliaram extratos aquosos de plantas medicinais quanto à capacidade de influenciar nos fatores de virulência de *E. coli*. Os resultados mostraram que *B. pendula* foi capaz de reduzir significativamente a mobilidade e a formação de biofilme deste micro-organismo.

Gründemann et al. (2011) investigaram a capacidade anti-proliferativa do extrato aquoso de folhas de *B. pendula* em linhagem celular de linfócitos humanos, obtendo como resultados inibição da proliferação e da divisão celular. Wacker et al. (2012) analisaram os efeitos do extrato aquoso de folhas de *B. pendula* sobre córnea inflamada de ratos e *in vitro* sobre cultura de células T. Os resultados mostraram que *B. pendula* inibiu a proliferação de células T por indução da apoptose e *in vivo* o extrato atrasou significativamente o aparecimento de opacificação da córnea, bem como reduziu a quantidade de células

CD4+, CD45+, o que permitiu inferir que *B. pendula* é um composto promissor no tratamento de doenças inflamatórias.

B. pendula contém princípios ativos com algumas propriedades biológicas, como a betulina (Dehelean et al., 2012; Duric et al., 2013), o ácido betulínico (Duric et al., 2013) e seus derivados (Yang et al., 2012), treterpenos, ácido oleanólico e lupeol (Duric et al., 2013). No estudo de Dehelean et al. (2012), o extrato etanólico e o composto ativo betulina extraído do extrato da casca da árvore de *B. pendula* foram avaliados quanto aos seus efeitos sobre quatro linhagens de células de carcinomas humanos e sobre inflamação em ratos. Foi observada ação anti-proliferativa semelhante tanto do extrato como da betulina em todas as linhagens celulares estudadas, porém em relação ao efeito anti-inflamatório, o extrato foi mais potente, provavelmente pela agregação dos efeitos de outros compostos presentes nele.

Yang et al. (2012) avaliaram os derivados do ácido betulínico em cinco linhagens de células tumorais humanas: MGC-803, PC3, A375, Bcap-37 e A431, mostrando que esses compostos inibiram o crescimento de todas as linhagens tumorais estudadas.

Duric et al. (2013) avaliaram a atividade antibacteriana de cinco extratos metanólicos de diferentes partes da *B. pendula* e de seus compostos ativos, como betulina, ácido betulínico, ácido oleanólico e lupeol contra *Bacillus subtilis*, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* e *Pseudomonas aeruginosa*. Os resultados mostraram que o ácido oleanólico foi o composto mais eficiente contra *S. aureus* e *B. subtilis* e os extratos apresentaram ação contra *S. aureus*, *B. subtilis* e *P. aeruginosa*. Contudo, *E. coli* foi resistente a todos os extratos e compostos testados.

Não foram encontrados na literatura estudos que avaliam a ação de *B. pendula* sobre biofilmes fúngicos, bem como o uso do extrato glicólico desta planta. Portanto, os resultados do presente trabalho colaboram com o conhecimento científico desta espécie vegetal expandindo a possibilidade de seu uso terapêutico.

2.2 Micro-organismos alvos da pesquisa

2.2.1 Leveduras do gênero *Candida*

As leveduras do gênero *Candida* são organismos fúngicos comensais que compõem a microbiota do ser humano saudável e podem ser encontradas em mucosa oral, genital e nos tratos gastrointestinal e urinário (Tsai et al., 2013). Contudo, algumas espécies são oportunistas e sob determinadas situações do hospedeiro, como uso de imunossupressores ou de antibióticos de amplo espectro, imunidade comprometida, rompimento da barreira da mucosa, radio e quimioterapia, podem ocasionar infecções, normalmente candidoses oral e urogenital. Em alguns casos pode ocorrer candidemia, infecção sistêmica com alto potencial de mortalidade causada por *Candida* spp., geralmente em pacientes hospitalizados (Giri, Kiindo, 2012; Rodrigues et al., 2014).

A patogenicidade das espécies de *Candida* também está associada a determinados fatores de virulência, como a capacidade de formar hifas, que pode favorecer a invasão nos tecidos do hospedeiro; de aderir e formar biofilme em superfícies bióticas e abióticas; e de produzir enzimas hidrolíticas, como proteases e fosfolipases (Silva et al., 2012). Vários agentes antifúngicos para o tratamento de candidoses estão disponíveis comercialmente, como a nistatina, anfotericina B, clotrimazol, miconazol, itraconazol, fluconazol e cetoconazol. No entanto, esses fármacos podem produzir efeitos adversos, como, por exemplo, gosto amargo, reações alérgicas e seleção de células resistentes (Ferreira et al., 2015). Neste cenário, observa-se a necessidade de se investigar outros compostos que apresentem atividade antifúngica, como os extratos vegetais, com menores efeitos tóxicos.

São conhecidas aproximadamente 200 espécies do gênero *Candida*, dessas, as espécies *C. albicans*, *C. glabrata*, *C. tropicalis*, *C. parapsilosis*, *C. krusei* e *C. lusitaniae* são mais comumente associadas à infecções em humanos (Sankari et al., 2015). Todavia, *C. albicans* ainda apresenta a maior importância médica por predominar nos casos de candidemia e candidoses (Zarrin, Mahmoudabadi, 2009).

C. albicans é o fungo predominante tanto na microbiota de indivíduos saudáveis, quanto em infecções fúngicas, sendo responsável por causar cerca de 90% de candidose vulvovaginal e de 50 a 60% das candidoses invasivas (Tsai et al., 2013). Além disso, *C. albicans* vem se destacando como um dos principais agentes de infecções nosocomiais sendo considerada a terceira maior causa de infecções de alto nível de mortalidade, relacionadas com uso de cateter intravascular (Chen HF, Lan, 2015). O sucesso na colonização e na infecção de *C. albicans* se deve principalmente pela capacidade de mudar sua morfologia, uma vez que, se encontra na forma de levedura, quando comensal ou para se disseminar no organismo, e de hifa ou pseudo-hifa, para invadir os tecidos do hospedeiro, bem como se aderir e formar biofilme com produção de enzimas hidrolíticas (Tsai et al., 2013).

C. albicans é uma das principais espécies do gênero *Candida* de interesse médico, contudo há outras espécies com semelhante relevância, como *C. dubliniensis* que, embora seja menos frequente que *C. albicans*, já foi isolada do sangue de pacientes com infecção nosocomial. *C. dubliniensis* foi encontrada em 1995 em pacientes com síndrome da imunodeficiência adquirida na cidade de Dublin, Irlanda (Sullivan et al., 1995). *C. dubliniensis* se assemelha fenotipicamente a *C. albicans*, como na formação de tubo germinativo e clamidoconídeos (McMillan et al., 2014). Uma característica relevante de *C. dubliniensis* é a capacidade de adquirir resistência aos compostos

azólicos por meio da atividade aumentada das bombas de efluxo, das modificações da enzima alvo destes fármacos e das alterações na via de biossíntese do ergosterol, componente importante da membrana citoplasmática de levedura (Sullivan et al., 2005).

Nas últimas duas décadas, o número de infecções fúngicas causadas por *Candida não-albicans* vem aumentando significativamente e a principal espécie neste contexto é *C. glabrata*, a qual já se sabe ser responsável por cerca de 15% das infecções sistêmicas causadas por *Candida* (Rodrigues et al., 2014). *C. glabrata* se caracteriza por ser a única espécie de *Candida* conhecida que não forma pseudohifas em temperaturas acima de 37 °C (Fidel et al., 1999), bem como não foi relatada a formação de hifa ou pseudo-hifa em cepas clínicas isoladas de infecções (Kaur et al., 2005). Contudo, *C. glabrata* possui outros fatores de virulência que favorece a sua invasão no hospedeiro, como a capacidade de adesão e formação de biofilme e secreção de enzimas hidrolíticas (Kaur et al., 2005; Rodrigues et al., 2014).

Outra espécie de *Candida* que vem ganhando importância clínica é *C. guilliermondii* por ser considerada um patógeno emergente, uma vez que esta espécie é propensa a desenvolver resistência aos agentes antifúngicos mesmo durante o tratamento (Papon et al., 2013). Além disso, está presente em 1 a 3% das candidemias, na maioria das vezes em pacientes com câncer (Pfaller et al., 2006), sendo de grande importância estudar tratamentos alternativos para este micro-organismo. *C. guilliermondii* é de interesse também em biotecnologia, já que em condições de limitação de ferro pode superproduzir riboflavina, um composto de inúmeras aplicações, como corante alimentar e composto vitamínico.

C. krusei é outra espécie de *Candida não-albicans* de interesse médico por corresponder a 1 a 5% das causas de candidemias e apresentar resistência intrínseca ao fluconazol (Schuster et al., 2013).

Huong et al. (2013) analisaram 135 amostras de biópsia de estômago de pacientes saudáveis e com doenças gastrointestinais devido à colonização por *Candida* spp. E verificaram que *C. krusei* estava presente em 20% de pacientes com hemorragia, 52% com úlcera e em 100% com gastrite, não sendo detectada em pacientes saudáveis. *C. albicans* apesar de ser a espécie de fungo mais comum no trato gastrointestinal de indivíduos saudáveis, não foi detectada em pacientes com distúrbios estomacais, ao contrário de *C. krusei* que se mostrou mais adaptada para colonizar o estômago desses pacientes.

C. tropicalis também se destaca na área da saúde por causar cerca de 30% das infecções por *Candida* não-*albicans* e apresentar alta mortalidade, aproximadamente 50%, em paciente com saúde debilitada. A preocupação com esta levedura se deve também ao aumento de sua resistência a antifúngicos, como o voriconazol e fluconazol (Mesa-Arango et al., 2013). Em um estudo epidemiológico conduzido no Brasil, *C. tropicalis* foi a segunda espécie de *Candida* mais frequentemente recuperada em casos de candidemia. Além disso, parece que *C. tropicalis* apresenta maior potencial de disseminação em indivíduos neutropênicos quando comparada a *C. albicans* e outras *Candida* não-*albicans* (Colombo et al., 2007).

2.2.2 Bactérias

Escherichia coli é uma bactéria Gram-negativa que está presente na microbiota intestinal em humanos. A maioria das cepas não são patogênicas, porém alguns sorotipos podem causar infecções graves como bacteriemia, meningite, infecção alimentar e no trato urinário (Anes et al., 2015). *E. coli* é o principal agente de bacteriemias, responsável por cerca de 30% de todos os casos (Livermore, 2012). O estudo de

Lautenbach et al. (2010) demonstrou que, durante o tratamento com antibióticos, 50% dos isolados de *E. coli* exibiu superprodução na bomba de efluxo da membrana celular, o que indica ser um importante mecanismo de resistência dessa bactéria.

Pseudomonas aeruginosa é outra bactéria Gram-negativa patógeno-opportunista, frequentemente relacionada a infecções hospitalares e representa a principal causa de mortalidade em pacientes com fibrose cística (Mai-Prochnow et al., 2015). *P. aeruginosa* é capaz de adquirir resistência a múltiplos grupos de agentes antimicrobianos, como os β -lactâmicos, aminoglicosídeos e fluoroquinolonas, dificultando e encarecendo o tratamento de suas infecções (Hu et al., 2015). A alta taxa de resistência a antibióticos se deve em grande parte a sua capacidade de formar biofilme. *P. aeruginosa* produz ao menos três tipos diferentes de exopolissacarídeos, os quais constituem importantes componentes da matriz do biofilme que protegem as células de substâncias antimicrobianas (Toyofuku et al., 2012).

As bactérias Gram-negativas possuem características específicas que, segundo alguns autores (Li, Nikaido, 2009; Livermore, 2012), lhes conferem maior resistência a antibióticos em relação às bactérias Gram-positivas. A parede de bactérias Gram-negativas possui uma membrana externa formada de fosfolípidos contendo lipopolissacarídeos que, além de ser um fator de virulência dessas bactérias, funciona como uma barreira à entrada de moléculas grandes e hidrofóbicas e dificulta a entrada de outras moléculas (Livermore, 2012).

Staphylococcus aureus é uma bactéria Gram-positiva que faz parte da microbiota normal da nasofaringe e da pele de humanos. Contudo, é um patógeno oportunista e em alimentos contaminados ou em contaminação hospitalar, por exemplo, pode provocar infecções severas como fasciíte necrosante, endocardites e pneumonia (Espina et al., 2015). Gerber et al. (2009) demonstraram que, entre 2002 e 2007, houve um aumento maior que três vezes de infecções causadas por *S. aureus*

resistente à meticilina (MRSA) e que este micro-organismo representa a causa de 51% de todas as infecções por *Staphylococcus* spp. O crescente aumento de cepas MRSA evidencia a importância de se estudar novos compostos que sejam eficazes no seu tratamento.

Streptococcus mutans também é uma bactéria Gram-positiva. É um dos agentes causadores de cárie dentária de superfície lisa. Metaboliza os carboidratos da dieta alimentar e produz ácidos que reduz o pH da saliva levando a desmineralização dos dentes. A habilidade de *S. mutans* de produzir ácido (acidogênica) e tolerá-lo (acidúrica) lhe conferem a capacidade cariogênica (Hasan et al., 2015). Ao colonizar a cavidade oral, *S. mutans* estabelece o biofilme cariogênico. Desse modo, sua virulência tem sido atribuída à versatilidade em se adaptar a condições adversas e formar biofilme junto com outras espécies (Burnside, Rajagopal, 2011). Adicionalmente, foi demonstrado que *S. mutans* organizado em biofilme é mais tolerante ao pH ácido, em comparação a culturas planctônicas, característica fundamental para o desenvolvimento da cárie (Krzyściak et al., 2014). A lesão de cárie representa um grande problema de saúde pública que pode causar grandes prejuízos econômicos e em regiões subdesenvolvidas levar a perda precoce dos dentes (Guo et al., 2015).

Inúmeras bactérias Gram-positivas têm potencial de causar mortalidade, muitas delas são encontradas em ambientes hospitalares, como estafilococos, enterococos, estreptococos e clostrídeos (McClay et al., 2015). Essas bactérias possuem uma parede celular mais espessa, constituída de multicamadas de peptidoglicanos e ácidos teicóicos, ambos importantes para manter a integridade celular, além de proteger a célula bacteriana do sistema imune do hospedeiro e de antibióticos. Por estes motivos, estes componentes costumam ser alvo de agente antimicrobianos (Czarny et al., 2014). O ácido teicóico também é considerado um fator de virulência, uma vez que auxilia a bactéria na adesão e formação de biofilme, processos essenciais para a colonização

e infecção no hospedeiro (Brown et al., 2013).

De acordo com a literatura, pode-se verificar a importância do estudo e uso terapêutico de novas substâncias antimicrobianas, uma vez que muitos micro-organismos patogênicos desenvolvem resistência aos antimicrobianos convencionais. Desta forma, o estudo do extrato glicólico de bétula sobre fungos do gênero *Candida*, bactérias Gram-negativas e Gram-positivas pode revelar um promissor agente antimicrobiano.

2.3 Avaliação das atividades antimicrobiana e anti-inflamatória de extratos vegetais

Sabe-se que muitos micro-organismos se tornam cada vez mais resistentes a determinadas substâncias devido à pressão seletiva frente ao uso dos antimicrobianos (Galan et al., 2013). A fim de se encontrar fármacos alternativos para o tratamento de doenças causadas por micro-organismos, recentemente diversos estudos estão sendo realizados no propósito de avaliar a ação antimicrobiana de extratos vegetais.

Oliveira JR et al. (2013) avaliaram a atividade antimicrobiana de extratos glicólicos de *Equisetum arvense* L., *Glycyrrhiza glabra* L., *Punica granatum* L. e *Stryphnodendron barbatiman* Mart. contra *S. aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *S. mutans*, *C. albicans*, *C. tropicalis* e *C. glabrata* e analisaram a citotoxicidade destes extratos em cultura de macrófagos (RAW 264.7). Todos os extratos foram efetivos contra os micro-organismos avaliados e o extrato de *G. Glabra* exibiu a menor citotoxicidade.

Al-Massarani e El-Dib (2015) avaliaram o potencial antimicrobiano do extrato etanólico e aquoso da planta saudita *Alhagi graecorum* contra 19 cepas de micro-organismos patogênicos em culturas

planctônicas e também analisaram sua citotoxicidade em cinco linhagens de células humanas. Obtiveram alta atividade antimicrobiana do extrato etanólico, o que não ocorreu com o extrato aquoso, que não apresentou efeito para nenhuma das cepas testadas, mostrando a importância de se avaliar o extrato não alcoólico, pois muitas vezes é o álcool que apresenta a ação antimicrobiana. Além disso, o extrato etanólico apresentou considerável citotoxicidade contra as linhagens celulares estudadas.

Shetty et al. (2013) também compararam a atividade antimicrobiana do extrato alcoólicos e aquoso de alho contra patógenos periodontais. O extrato aquoso obteve a concentração inibitória mínima (CIM) de 16,6 µg/mL contra *Porphyromonas gingivalis*, sendo mais eficiente que o extrato alcoólico cuja CIM apresentou-se maior que 62,5 µg/mL. Porém, *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* se mostrou resistente para ambos os extratos.

Agyare et al. (2013) investigaram as propriedades antimicrobianas de extratos etanólicos das folhas e cascas do caule de *Funtumia elastica* sobre *E. coli*, *P. aeruginosa*, *S. aureus*, *Bacillus subtilis*, *C. albicans*, *Aspergillus flavus* e *Aspergillus niger*. Os extratos apresentaram atividade antimicrobiana, com CIM variando de 125 a 1750 µg/mL. Donia et al. (2014) verificaram ação antimicrobiana do extrato alcóolico de *Emex spinosa* para *S. aureus*, *Streptococcus pyogenes* e *B. subtilis*, mostrando que o extrato teve ação efetiva contra os microorganismos analisados. Snowden et al. (2014) avaliaram diversos extratos de plantas que foram historicamente sugeridos com propriedades antimicrobianas contra *S. aureus* e os resultados demonstraram que os extratos mais efetivos foram de *Salvia officinalis*, *Eucalyptus globulus*, *Coleus forskohlii*, *Coptis chinensis* e *Larrea tridentata*.

Pieri et al. (2012) estudaram o efeito bacteriostático do óleo de copaíba contra *S. mutans*, encontrando inibição de crescimento bacteriano em baixa concentração do fitoterápico (0,78 µL/mL). Malolo et al. (2015) avaliaram a atividade antimicrobiana do extrato metanólicos de

Helichrysum foetidum e *Helichrysum mechowianum* e de seus compostos isolados sobre o crescimento de *Bacillus subtilis* e *Cladosporium cucumerinu*, mostrando que tanto os extratos quanto seus compostos isolados apresentaram alto potencial de inibição de crescimento nas espécies analisadas.

Teodoro et al. (2015) avaliaram a atividade antifúngica do extrato aquoso de *Buchenavia tomentosa* contra cepas clínicas e padrão de *Candida albicans* e não-*albicans*, obtendo valores de CIM entre 0,2 a 25 mg/mL, sendo mais efetivo contra espécies não-*albicans*, tanto para cepas padrão, quanto clínicas. Neste mesmo estudo foi verificado que o extrato apresentou baixa citotoxicidade em células de fibroblastos até a concentração de 25 mg/mL.

Contudo, poucos estudos avaliaram a eficácia de fitoterápicos em micro-organismos organizados em biofilmes, onde podem apresentar resistência até mil vezes maior que em células planctônicas da mesma espécie (Venkatesan et al., 2015).

Esta resistência das bactérias organizadas em biofilmes foi verificada por Lee (2013) ao avaliar os efeitos antimicrobianos de extratos metilalcoólicos vegetais de *Cudrania tricuspidata*, *Sophora flavescens*, *Ginkgo biloba* e *Betula schmidtii*, em *S. mutans* planctônico e em biofilme. Como resultados, *S. mutans* em cultura planctônica mostrou susceptibilidade a todos os extratos, porém em biofilme a sensibilidade foi maior ao *S. flavescens*.

Albuquerque et al. (2013) analisaram o efeito antiaderente do extrato hidroalcoólico de *Lippia sidoides* sobre *S. mutans*, *Streptococcus sanguinis* e *Lactobacillus casei*. O extrato demonstrou efeito antiaderente até a concentração 1:16 para os micro-organismos estudados, porém não foi avaliada a ação do extrato sobre o biofilme já formado. O estudo de Oliveira SA et al. (2014) avaliaram os efeitos antimicrobianos de óleos essenciais de *Citrus limonum* e *Citrus aurantium* em biofilmes mistos de *C. albicans*, *Enterococcus faecalis* e *E. coli*. Os autores constataram que

ambos os óleos essenciais apresentaram redução microbiana significativa para todos os micro-organismos no biofilme.

Em relação aos estudos de avaliação da atividade anti-inflamatória de extratos vegetais, muitos têm utilizado cultura de macrófagos de camundongo (RAW264.7), como Huang et al. (2013) que analisaram os efeitos anti-inflamatórios do extrato etanólico da raiz de *Pendulous monkshood* em macrófagos de camundongos estimulados por lipopolissacarídeo (LPS) e os resultados demonstraram o potencial terapêutico deste extrato nas doenças inflamatórias, já que houve uma diminuição significativa na produção de óxido nítrico (ON) e do estresse oxidativo intracelular. De modo similar, Chen X et al. (2015) analisaram a ação do extrato etanólico de *Ainsliaea fragans* na liberação de mediadores inflamatórios de RAW264.7 estimulado por LPS e verificaram que o extrato inibiu a expressão de fator de necrose tumoral alfa (TNF- α) e interleucina-6 (IL-6), bem como a produção de ON.

Yoon et al. (2013) investigaram a atividade anti-inflamatória do extrato metanólico da raiz de *Evodia leptota* em macrófagos (RAW 264.7) estimulados com LPS, analisando a produção de ON e prostaglandina E₂ (PGE₂). Os resultados demonstraram que este extrato diminuiu a produção de ON e PGE₂, de maneira dose-dependente. Gwon et al. (2013) demonstraram que a fração hexano de *Sargassum fulvellum* inibiu a produção de ON por macrófagos (RAW 264.7) estimulados por LPS, de maneira dose-dependente, bem como diminuiu a produção de citocinas pró-inflamatórias. Oyungerel et al. (2013) investigaram o efeito do extrato de *Magnolia sieboldii* na produção de citocinas pró-inflamatórias por macrófagos de camundongo estimulados por LPS. Concluíram que o extrato tem capacidade imunorregulatória, já que reduziu significativamente a produção de ON e de interleucina 1 beta (IL-1 β), IL-6, TNF- α e COX-2.

Sripanidkulchai e Junlatat (2014) investigaram a atividade farmacológica do extrato etanólico de *Phyllanthus emblica* e verificaram

que este extrato suprimiu a expressão de genes pró-inflamatórios, ciclooxigenase-2 (COX-2), óxido nítrico sintetase induzível (iNOS), TNF- α , interleucina 16 (IL-16) e IL-6 induzidos por LPS em macrófagos (RAW 264.7), também de maneira dose dependente. O estudo de Jeong et al. (2015) verificou que o extrato metanólico de *Liriodendron tulipifera* suprimiu a produção de TNF- α em macrófagos de camundongo estimulados por LPS, o que sugere regulação da resposta anti-inflamatória por este extrato. Liu et al. (2015) avaliaram a atividade anti-inflamatória do extrato etanólico de *Clematis terniflora in vivo*, induzindo inflamação em ratos, e *in vitro*, utilizando RAW 264.7. Os resultados mostraram que o extrato teve ação anti-inflamatória favorável em ratos, o que provavelmente foi relacionado à capacidade do extrato de inibir a liberação de ON e PGE₂, evidenciada nas células RAW 264.7 induzidas por LPS.

Estes estudos demonstram que o modelo *in vitro* da cultura de células RAW 264.7 é eficiente na avaliação do extrato vegetais em relação ao efeito anti-inflamatório, pela quantificação de moduladores inflamatórios, sendo interessante também analisar os efeitos citotóxicos, genotóxicos e anti-inflamatórios do extrato de bétula nesta linhagem celular.

3 PROPOSIÇÃO

Este trabalho se propôs a:

- a) avaliar a atividade antimicrobiana do extrato glicólico de *B. pendula* Roth sobre *C. albicans*, *C. dubliniensis*, *C. glabrata*, *C. guilliermondii*, *C. krusei*, *C. tropicalis*, *E. coli*, *P. aeruginosa*, *S. aureus* e *S. mutans* em culturas planctônicas e em biofilmes monotípicos;
- b) avaliar a citotoxicidade do extrato de bétula em culturas de macrófagos de camundongo (RAW 264.7) e de fibroblastos gengivais humanos (FMM-1);
- c) avaliar a genotoxicidade do extrato em macrófagos (RAW 264.7);
- d) avaliar a atividade anti-inflamatória do extrato em macrófagos (RAW 264.7) estimulados por lipopolissacarídeo (LPS) de *E. coli*.

4 MATERIAL E MÉTODOS

O extrato glicólico de folhas de bétula (*B. pendula* Roth) foi doado pela empresa Mapric (São Paulo, SP) a 200 mg/mL em propilenoglicol com o devido laudo (ANEXO A).

4.1 Avaliação da atividade antimicrobiana

A avaliação da atividade antimicrobiana do extrato foi realizada sobre cepas de referência (ATCC – *American Type Culture Collection*) de *C. albicans* (ATCC 18804), *C. dubliniensis* (ATCC MYA646), *C. glabrata* (ATCC 9030), *C. guilliermondii* (ATCC 6260), *C. krusei* (ATCC 6258), *C. tropicalis* (ATCC 13803), *E. coli* (ATCC 25922), *P. aeruginosa* (ATCC 15442), *S. aureus* (ATCC 6538) e *S. mutans* (ATCC 35688). As cepas foram provenientes do Laboratório de Microbiologia e Imunologia do Curso de Odontologia do ICT – UNESP.

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

Para a determinação da CIM foi utilizado o método de microdiluição em caldo, segundo *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI), normas M7-A9 (Cockerill III et al., 2012) para bactérias e M27-S4 (CLSI, 2012) para leveduras.

Para tanto, os micro-organismos que estavam armazenados a $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$, foram reativados em meio de cultura ágar Sabouraud-dextrose (Himedia, Mumbai, Índia) para as leveduras e ágar *Brain Heart Infusion* (BHI – Himedia, Mumbai, Índia) para as bactérias, incubados por 24 h a $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ para todas as cepas e com 5% CO_2 para *S. mutans*. Os inóculos foram preparados a partir da adição de colônias destes micro-organismos em solução fisiológica estéril (NaCl 0,9%) e padronizados em espectrofotômetro (B582, Micronal, São Paulo, Brasil) para o número de 10^7 UFC/mL (unidades formadoras de colônia por mililitro) para as bactérias e 10^6 UFC/mL para as leveduras, de acordo com os comprimentos de onda e as densidades ópticas presentes no Quadro 1. A concentração final em cada poço para as bactérias foi de 5×10^4 UFC/mL, conforme Cockerill III et al. (2012). As leveduras ainda passaram por diluições de 1:50 e depois 1:20 em meio RPMI 1640 (com glutamina, sem bicarbonato e com indicador vermelho de fenol) (Himedia, Mumbai, Índia), para alcançar a concentração no poço de $2,5 \times 10^3$ UFC/mL sugerida por *Clinical and Laboratory Standard Institute* (2012).

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

Micro-organismo	λ (nm)	DO
<i>Candida spp</i>	530	0,284
<i>P. aeruginosa</i>	630	0,09*
<i>E. coli</i>	590	0,362
<i>S. aureus</i>	490	0,447
<i>S. mutans</i>	398	0,560

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

O teste foi realizado em microplacas de 96 poços (TPP, Zollstrasse, Suíça), onde foram adicionados 100 µL de meio de cultura, 100 µL do extrato, apenas na primeira coluna de poços da microplaca, de onde partiram uma série de 10 diluições seriadas à base de 2, e por último os inóculos padronizados, no volume de 5 µL para as bactérias e de 100 µL para leveduras.

Foi realizado o controle positivo de crescimento somente com o meio de cultura e o inóculo, e o controle negativo com o meio de cultura e o extrato. Os meios utilizados foram caldo Müller Hinton (Himedia, Mumbai, Índia) para as bactérias, e meio RPMI 1640 (com glutamina, sem bicarbonato e com indicador vermelho de fenol) (Himedia, Mumbai, Índia) tamponado com MOPS [ácido 3- (N-morfolino) propanosulfônico (Sigma – Aldrich, St. Louis, EUA) pH 7,0 ± 0,1, para as leveduras.

Após incubação de 24 h a 37 °C (com 5% de CO₂ para *S. mutans*) a CIM foi determinada no primeiro poço (da direita para a esquerda) da microplaca que não apresentou turvações que indicassem crescimento microbiano.

Para determinação da CMM do extrato foi necessário inocular em ágar BHI ou Sabouraud-dextrose 100 µL da CIM e das concentrações acima subsequentes. Após 48 h de incubação a 37 °C, em placas onde não foi observado crescimento de colônias, foi determinada a CMM do extrato. Para os micro-organismos nos quais não foi possível determinar a CIM e CMM, foi feita a leitura em leitor de placa no comprimento de onda 630 nm afim de se obter a redução do crescimento nas diferentes concentrações do extrato.

O mesmo teste foi realizado para o propilenoglicol, que é o controle do veículo do extrato.

4.1.2 Avaliação da atividade antimicrobiana do extrato em biofilmes

Os biofilmes foram formados em poços de microplacas de 96 poços (TPP, Zollstrasse, Suíça). Para tanto, após reativação, colônias dos micro-organismos foram transferidas para caldo BHI (Himedia, Mumbai, Índia) para bactérias e em Yeast Nitrogen Base (YNB – Himedia, Mumbai, Índia) suplementado com 100 mM de glicose para fungos e esses inóculos incubados em estufa a 37 °C por 24 h. Depois desse período, a suspensão microbiana foi centrifugada (358 xg/10 min), o sobrenadante descartado e o *pellet* ressuscitado em solução fisiológica estéril (NaCl 0,9%) para lavagem do micro-organismo. Após novo processo de centrifugação, a suspensão microbiana foi padronizadas em espectrofotômetro (B582, Micronal, São Paulo, Brasil) a 10^7 UFC/mL em solução fisiológica estéril (NaCl 0,9%) de acordo com os comprimentos de onda e densidades ópticas presentes no Quadro 1, exceto para as espécies de *Candida*, cuja densidade óptica foi de 0,381.

Em seguida, foram acrescentados 200 µL/poço desta suspensão nos poços da microplaca. Após incubação (37 °C) de 90 min sob agitação (75 rpm), para aderência inicial, o sobrenadante foi descartado e acrescentado meio de cultura, sendo BHI para bactérias e YNB para *Candida* spp. Em seguida as placas voltaram para incubação a 37 °C sob agitação (75 rpm), exceto *S. mutans* que foi incubado a 37 °C com 5% de CO₂ sem agitação. O biofilme foi formado por 48 h, no entanto, após 24 h de incubação, o meio foi substituído por meio fresco.

Após este período, os biofilmes foram lavados com solução salina estéril (NaCl 0,9%) e colocados em contato com o extrato por 5 min ou 24 h, em três concentrações pré-determinadas em ensaios piloto (Quadro 2), totalizando 60 grupos experimentais para a avaliação antimicrobiana em biofilmes.

Quadro 2 – Relação dos 60 grupos experimentais na avaliação da atividade antimicrobiana do extrato glicólico de *B. pendula*

Micro-organismos	5 min – Concentração do extrato em mg/mL			24 h – Concentração do extrato em mg/mL		
<i>C. albicans</i>	25	12,5	6,25	25	12,5	6,25
<i>C. dubliniensis</i>	25	12,5	6,25	25	12,5	6,25
<i>C. glabrata</i>	25	12,5	6,25	25	12,5	6,25
<i>C. guilliermondii</i>	100	50	25	25	12,5	6,25
<i>C. krusei</i>	100	50	25	25	12,5	6,25
<i>C. tropicalis</i>	100	50	25	25	12,5	6,25
<i>E. coli</i>	200	100	50	100	50	25
<i>P. aeruginosa</i>	200	100	50	100	50	25
<i>S. aureus</i>	200	100	50	100	50	25
<i>S. mutans</i>	200	100	50	100	50	25

Solução salina estéril (NaCl 0,9%) e o meio de cultura foram utilizados como controle positivo de crescimento para o tratamento de 5 min e 24 h, respectivamente. Posteriormente, estas soluções foram descartadas, o biofilme foi lavado três vezes com solução fisiológica estéril (NaCl 0,9%), permanecendo 200 μ L em cada poço para a desagregação do biofilme com o auxílio do homogeneizador ultrassônico (SONICS Vibra-Cell™), com potência de 25% por 30 s.

Após, a suspensão obtida foi diluída de forma seriada e 20 μ L foram inoculados em gotas únicas em meio sólido (BHI ou Sabouraud-dextrose), em triplicata (Figura 1). Após incubação de 48 h a 37 °C, foram contadas as unidades formadoras de colônia (UFC) obtidas em cada gota e após calcular a média, o valor foi multiplicado por 50 e pela diluição utilizada, para se encontrar o número de UFC/mL.

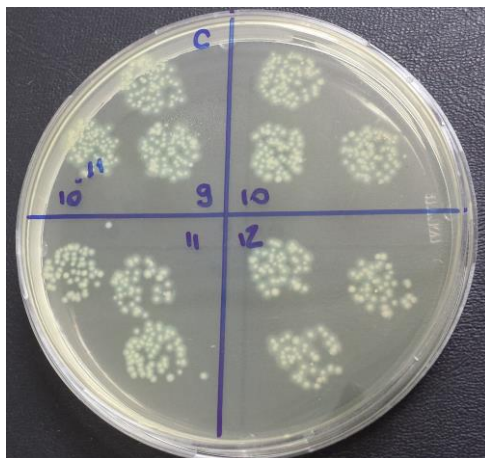


Figura 1 – Crescimento de colônias de *P. aeruginosa* nas gotas semeadas em ágar.

Foram realizados 3 experimentos independentes, com 4 repetições cada, totalizando n=12 para cada grupo experimental e para os controles positivos de crescimento.

Os resultados foram transformados em \log_{10} para comparação estatística entre os grupos. A porcentagem de redução do grupo tratado (T) foi calculada utilizando os resultados dos grupos controle (C) como referência, com a seguinte fórmula:

$$\% \text{ Redução} = (\text{Média UFC/mL}_C - \text{UFC/mL}_T) / \text{Média UFC/mL}_C \times 100$$

4.2 Avaliação da citotoxicidade

A avaliação da citotoxicidade do extrato glicólico de bétula foi realizada em culturas de camundongo RAW 264.7 por meio do teste colorimétrico MTT, que analisou a viabilidade celular pela atividade de esterases celulares, após exposição de 5 min ou 24 h, e pelo teste imunoenzimático ELISA que quantificou a produção de citocinas (IL-1 β e TNF- α).

A avaliação da citotoxicidade pelo teste MTT também foi realizada em células de fibroblastos gengivais humanos FMM-1, provenientes do Banco de Células da Faculdade de Odontologia da USP.

A cultura de RAW 264.7 é proveniente do Banco de Células do Rio de Janeiro – Associação Técnico Científica Paul Ehrlich (APABCAM – RJ). Ambas as culturas celulares foram cultivadas em meio de *Eagle* modificado por Dulbecco (DMEM – LGC Biotecnologia, Cotia, Brasil), suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB) (Invitrogen, Nova York, EUA) e mantidas em frascos de cultivo celular (TPP, Suíça), incubadas em estufa à temperatura de 37 °C, com 5% de CO₂.

O meio de cultura foi trocado a cada 48 h. As células foram utilizadas nos testes quando foi observado estado de subconfluência, caracterizado pela ocupação de mais de 70% do frasco. Para tanto, a monocamada de células foi desagregada do assoalho do frasco de cultura com auxílio de um varredor celular, as células suspensas foram centrifugadas por 5 min a 504 xg (Centrífuga Hermle z300k, Alemanha). Foi aplicado o teste de exclusão pelo azul de Trypan, para ser quantificado o número de células viáveis no contador celular automatizado (Countess Cell, Invitrogen, Nova York, EUA).

4.2.1 Análise da viabilidade celular pelo teste MTT

Foi realizada análise da atividade metabólica das células viáveis pelo método de redução do brometo de 3(4,5-dimetiltiazol-2-yl)2,5-difeniltetrazólio (MTT) em formazina por esterases celulares. A solução de MTT foi preparada a partir da suspensão de 0,5 mg do pó de MTT (Sigma Aldrich Co., Alemanha) em 1 mL de *Phosphate Buffer Saline* (PBS) (Cultilab, Brasil) estéril.

Em microplacas de 96 poços (TPP, Zollstrasse, Suíça) foram adicionados 200 µL de meio DMEM + 10% SFB contendo 2×10^4 células viáveis. Estas placas foram incubadas (37 °C, com 5% de CO₂) por 24 h para que ocorra aderência celular nos poços da microplaca. Em seguida, o sobrenadante foi descartado e acrescentados 200 µL/poço de 10 concentrações do extrato diluído de forma seriada na base 2 no meio DMEM. Para a cultura FMM-1, as concentrações testadas foram aquelas capazes de causar redução nos biofilmes. Foram utilizados poços-controles, contendo apenas células com meio de cultura. O n foi igual a 10 para todos os grupos. O período de incubação foi de 5 min e 24 h. Após, o material foi descartado e os poços foram lavados com PBS.

Para verificação da viabilidade da cultura, foram adicionados 100 µL/poço da solução de MTT e as placas voltaram para incubação por período de 1 h, abrigadas da luz. Posteriormente, esta solução foi descartada e foram adicionados 100 µL/poço de dimetilsulfóxido (DMSO – Sigma) para expor os cristais de formazan produzidos, após absorção do sal de MTT, por células viáveis. Após incubação de 10 min e agitação por mais 10 min em mesa agitadora. A absorbância dos poços foi lida em leitora de microplacas com comprimento de onda de 570 nm (Figura 2). As densidades ópticas (DO) obtidas foram convertidas em percentual de viabilidade celular empregando a seguinte fórmula:

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

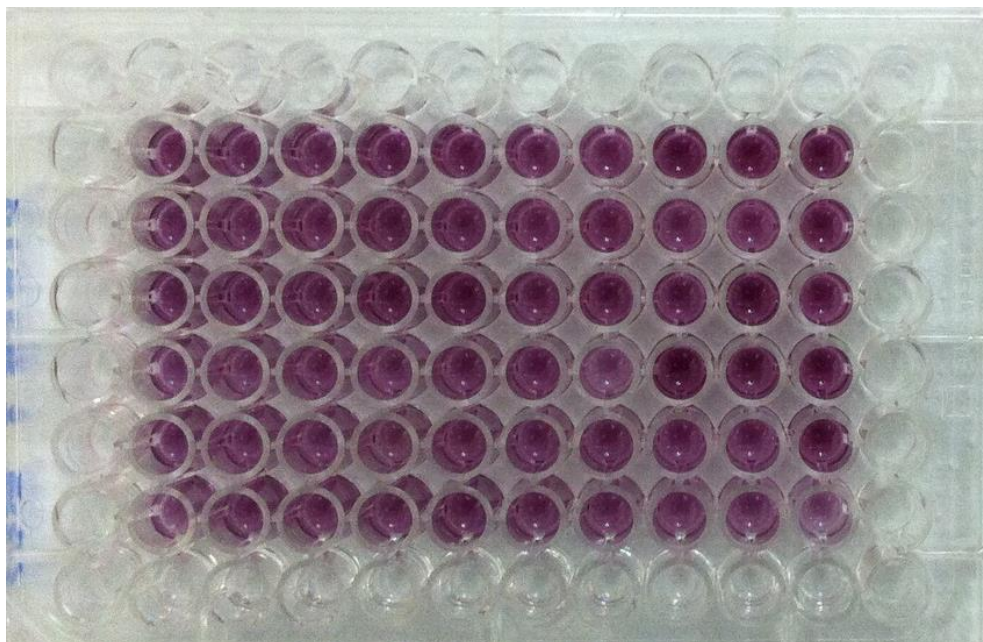


Figura 2 – Cultura de RAW 264.7 em placa de 96 poços após reação com o MTT e DMSO. Quanto maior a intensidade da cor púrpura maior a viabilidade celular.

4.2.2 Ensaios de citotoxicidade pela produção de citocinas IL-1 β e TNF- α por macrófagos (Oliveira et al., 2013)

Em placas de 24 poços (TPP, Zollstrasse, Suíça) foram acrescentadas 5×10^5 células viáveis por poço, sendo o volume completado com meio DMEM + 10% SFB para 1 mL. As placas foram incubadas (37 °C, com 5% de CO₂) por 24 h para aderência das células. Após, o meio foi removido e adicionado o extrato diluído em meio DMEM em concentrações que não comprometeram a viabilidade celular pelo método do MTT, as quais foram 12,5, 25 e 50 mg/mL para exposição de 5 min e 0,39, 0,78 e 1,56 mg/mL para exposição de 24 h. Para o grupo controle foi utilizado apenas o meio DMEM + 10% SFB. O *n* foi igual a 10 para todos os grupos. Para o grupo com exposição de 5 min, após o tempo de contato o sobrenadante foi descartado, as células foram

lavadas duas vezes com PBS e acrescido meio de cultura (Figura 3). As placas seguiram novamente para incubação por 24 h.

Após este período, os sobrenadantes de todos os grupos foram coletados, armazenados em microtubos e congelados em freezer (-20 °C) para posterior quantificação de citocinas pelo teste imunoenzimático ELISA.

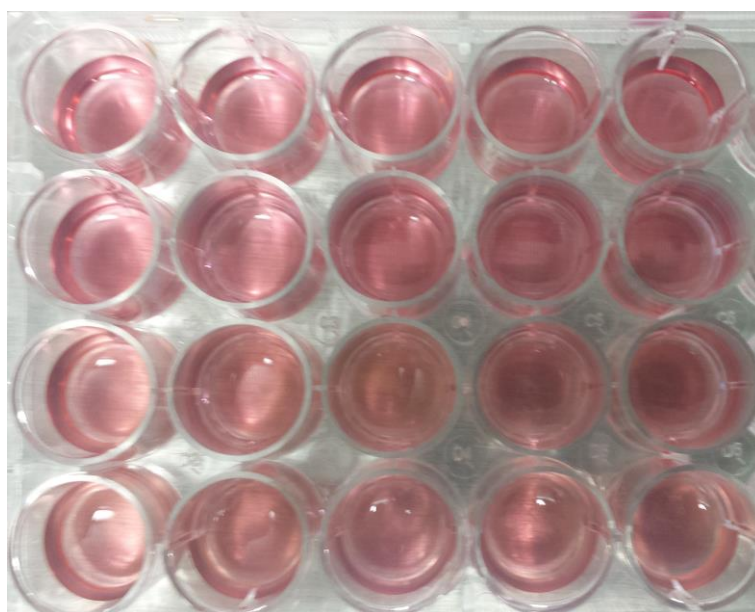


Figura 3 – Cultura de RAW264.7 após tratamento com diferentes concentrações do extrato, mostrando o sobrenadante que foi coletado para a quantificação de citocinas.

4.2.2.1 Ensaio imunoenzimático ELISA

Microplacas de 96 poços (Nunc Thermo Scientific, Waltham, EUA) foram sensibilizadas com anticorpos de captura (anti-TNF- α , anti-IL-1 β ou anti-IL10) de camundongo (R&D Systems, Minneapolis, EUA) e mantidas *overnight* em temperatura ambiente. No dia seguinte, as microplacas foram lavadas com PBS contendo Tween 20 (PBS-T) e bloqueadas com soro albumina bovina (BSA, 0,1%) por 1 h.

Após, as microplacas foram lavadas com PBS-T e receberam os sobrenadantes da cultura de células (100 μ L por poço) e os padrões das citocinas com concentrações conhecidas (curva-padrão). Após 2 h, as placas foram lavadas (PBS-T) e acrescentados anticorpos de detecção anti-TNF- α , anti-IL-1 β ou anti-IL10 marcados com biotina. Após 2 h, a reação foi revelada com solução contendo substrato cromogênico e peróxido de hidrogênio. A reação foi bloqueada após 20 min com ácido sulfúrico 2 N (Figura 4). As densidades ópticas (DO) foram lidas no leitor de microplacas (Biotek) com comprimento de onda de 450 nm.

Após obtenção das DO foram determinados os níveis de TNF- α , IL-1 β ou IL-10 (pg/mL) das amostras de sobrenadantes celulares com auxílio do programa GraphPad Prism 5.0.

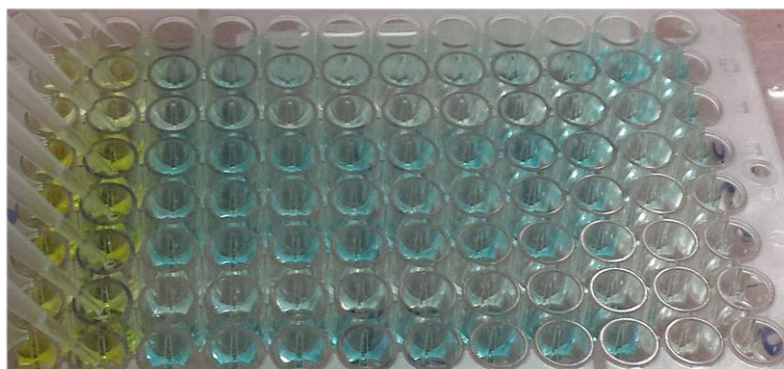


Figura 4 – Ensaio de ELISA, mostrando a última etapa quando há o bloqueio da reação cromogênica pelo ácido sulfúrico 2 N.

4.3 Avaliação da genotoxicidade (teste de micronúcleos)

Os macrófagos (RAW 264.7) foram cultivados em meio DMEM (LGC Biotecnologia, Cotia, Brasil) suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB) (Invitrogen, Nova York, EUA) a 37 °C e 5% CO₂. Para o teste, 2 x 10⁴ células foram cultivadas em poços de placas de 24 poços

(TPP, Zollstrasse, Suíça) por 24 h a 37 °C em atmosfera de 5% CO₂. Após este período, as células foram expostas por 24 h ao extrato diluído em DMEM + 10% SFB nas seguintes concentrações: 0,78, 1,56, 3,13, 25, 50 e 100 mg/mL. Utilizou-se o meio DMEM como controle negativo.

Após, os sobrenadantes foram descartados e as células lavadas com PBS-T. Prosseguindo, as células foram fixadas com formol 4% por 10 min, lavadas novamente com PBS-T e acrescentados 200 µL de PBS-T e uma gota do reagente DAPI (Sigma-Aldrich) em cada poço.

Os micronúcleos foram analisados em microscópio de fluorescência, sendo avaliadas 1000 células/poço por concentração. Os micronúcleos foram identificados como estruturas de DNA contidas no citoplasma claramente separados do núcleo principal, cercados por uma membrana nuclear, e incluindo uma área menor que 1/3 da área do núcleo principal. Foram contadas as células com menos de cinco micronúcleos.

4.4 Avaliação da atividade anti-inflamatória

Foram cultivadas em placas de 24 poços (TPP, Zollstrasse, Suíça) 5 x 10⁵ células/mL de macrófagos (RAW 264.7) por 24 h. Após incubação, o sobrenadante foi descartado e foi acrescentado meio fresco (DMEM + 10%SFB) no grupo controle e o extrato diluído em meio DMEM nas seguintes concentrações: 12,5, 25 e 50 mg/mL em 5 min e 0,39, 0,78 e 1,56 mg/mL em 24 h. Essas concentrações não comprometeram a viabilidade celular nos experimentos de citotoxicidade e não induziu a produção de citocinas pró-inflamatórias detectada pelo teste ELISA. Ao mesmo tempo, foi acrescentado lipopolissacarídeo (LPS) de *E. coli* (Sigma-Aldrich, St. Louis, EUA) na concentração de 1 µg/mL em cada poço. As placas foram incubadas por dois períodos distintos: 5 min e

24 h (37 °C e 5% de CO₂). Sendo que para os grupos de 5 min o sobrenadante foi retirado, os poços lavados com PBS, acrescentado meio DMEM + 10%SFB e as placas novamente incubadas por mais 24 h.

Posteriormente, o sobrenadante foi coletado e armazenado sob refrigeração (-20 °C) para posterior quantificação de citocinas pró-inflamatórias (IL-1 β e TNF- α) e anti-inflamatórias (IL-10), como descrito no subitem 4.2.2.1, e óxido nítrico.

A produção de óxido nítrico nos sobrenadantes de cultura de macrófagos foi determinada indiretamente pela concentração de nitrito detectada pelo reagente de Griess. Antes do início do teste, os sobrenadantes foram centrifugados a 504 xg por 10 min.

O reagente de Griess foi preparado misturando três soluções: solução A contendo 0,6 g de ácido sulfanílico dissolvido em 70 mL de água destilada quente. Após a solução ter esfriado, foram adicionados 20 mL de ácido clorídrico concentrado e de água destilada suficiente para 100 mL. Solução B produzida a partir de 0,6 g de alfa-naftalamina dissolvida em 20 mL de água destilada e 1 mL de ácido clorídrico. O volume foi completado com água destilada para 100 mL. E solução C produzida a partir 16,4 g de acetato de sódio na forma hidratada em água destilada no volume de 100 mL.

Em microplaca de 96 poços (TPP, Zollstrasse, Suíça), foram acrescentados 100 μ L das amostras dos sobrenadantes e o mesmo volume do reagente de Griess em cada poço. Depois de 10 min (Figura 5), a leitura foi realizada no leitor de microplacas com comprimento de onda de 570 nm. Para o cálculo da concentração de nitrito, foram utilizadas amostras padrão de nitrito de 100 a 0,78 μ M, constituindo uma curva-padrão.

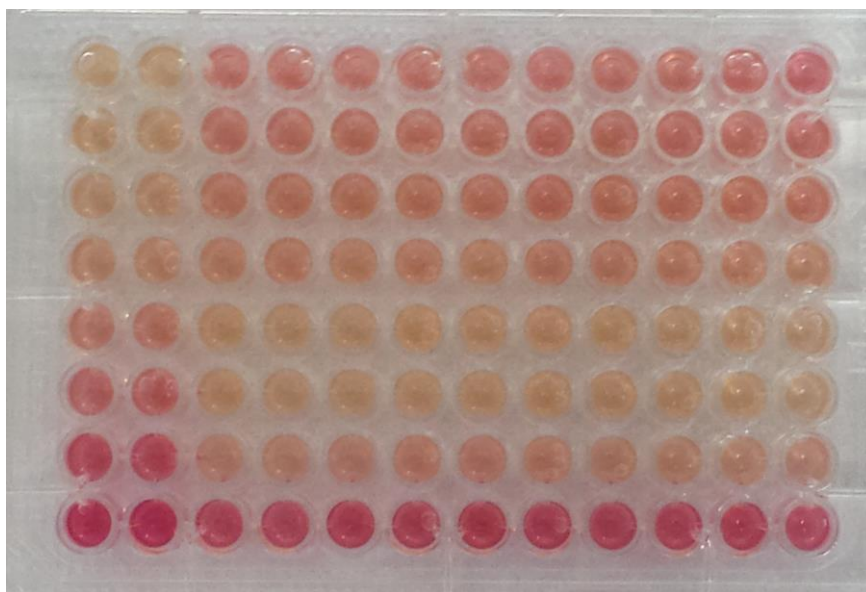


Figura 5 – Placa de 96 poços contendo os sobrenadantes das células com o Reagente de Griess para quantificação de ON.

4.5 Análise estatística

A análise estatística foi realizada no Programa *Graphpad Prism*[®] 5.0. Para dados paramétricos foi utilizado o método ANOVA complementado pelo Teste de Tukey, com nível de significância de 5% ($p \leq 0.05$). Os dados não-paramétricos foram analisados pelo método Kruskal-Wallis, complementado pelo Teste de Dunn com nível de significância de 5% ($p \leq 0.05$). Os resultados foram expressos nas médias dos grupos experimentais e controle \pm o desvio-padrão.

5 RESULTADOS

5.1 Atividade antimicrobiana

5.1.1 Culturas planctônicas

Nos testes de microdiluição em caldo, o extrato glicólico de bétula apresentou ação antifúngica semelhante nas diferentes espécies de *Candida* com CIMs entre 0,78 e 3,13 mg/mL e CMMs entre 3,13 e 6,25 mg/mL. Para as bactérias, nas concentrações testadas foi possível se determinar as CIM e CMM somente contra *P. aeruginosa*, as quais foram de 12,5 e 25 mg/mL, respectivamente (Tabela 1). Para as outras bactérias foi necessário fazer a leitura das densidades ópticas dos poços para verificar a redução do crescimento microbiano. Para *E. coli*, a maior redução do crescimento foi de 98% a 25 mg/mL. Para *S. aureus* a 50 mg/mL o extrato reduziu 93% e para *S. mutans* nas concentrações de 50 e 100 mg/mL houve redução maior que 99%, conforme mostra figura 6. O propilenoglicol não afetou o crescimento dos micro-organismos em culturas planctônicas.

Tabela 1 – Concentração Inibitória Mínima (CIM) e Concentração Microbicida Mínima (CMM) do extrato (concentrações em mg/mL)

Micro-organismo	CIM	CMM
<i>Candida albicans</i>	1,56	3,13
<i>Candida dubliniensis</i>	0,78	3,13
<i>Candida glabrata</i>	1,56	6,25
<i>Candida guilliermondii</i>	1,56	3,13
<i>Candida krusei</i>	1,56	3,13
<i>Candia tropicalis</i>	3,13	6,25
<i>Escherichia coli</i>	>100	>100
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	12,5	25
<i>Staphylococcus aureus</i>	>100	>100
<i>Streptococcus mutans</i>	>100	>100

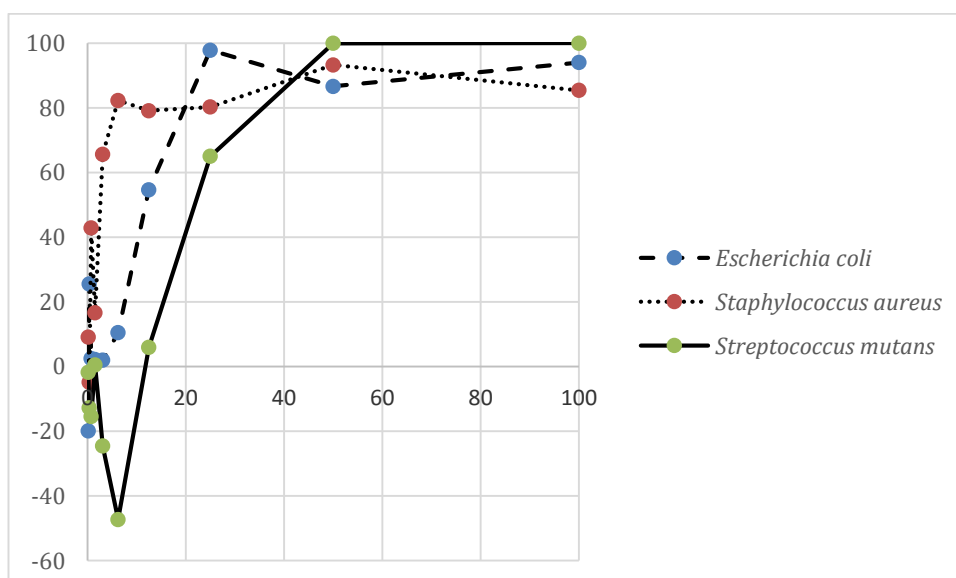


Figura 6 – Gráfico mostrando a porcentagem de redução do crescimento planctônico em relação ao controle (eixo Y), nas diferentes concentrações, em mg/mL, do extrato de bétula (eixo X).

5.1.2 Biofilmes

O extrato de bétula interferiu significativamente no crescimento do biofilme nas diferentes concentrações utilizadas e em contatos por 5 min e 24 h tanto em biofilmes de *Candida* spp (Tabelas 2 e 3), quanto em biofilmes bacterianos (Tabelas 4 e 5).

Tabela 2 – Crescimento de biofilmes fúngicos em UFC/mL (\log_{10}) tratados com extrato glicólico de bétula em diferentes concentrações (mg/mL) durante 5 min (n = 12). Em cada linha, médias seguidas de mesma letra não diferem significativamente ($p > 0,05$)

Fungo	Concentração do extrato em mg/mL					
	C*	100	50	25	12,5	6,25
<i>Candida albicans</i>	6,71 ^a ± 0,64	-	-	5,95 ^b ± 0,38	6,34 ^a ± 0,32	6,23 ^a ± 0,45
<i>Candida dubliniensis</i>	5,56 ^a ± 0,11	-	-	4,54 ^b ± 0,74	4,7 ^b ± 0,57	4,93 ^b ± 0,53
<i>Candida glabrata</i>	8,01 ^a ± 0,14	-	-	7,09 ^b ± 0,6	7,07 ^b ± 0,46	7,31 ^b ± 0,12
<i>Candida guilliermondii</i>	7,44 ^a ± 0,23	5,78 ^b ± 0,41	6,54 ^b ± 0,23	7,32 ^a ± 0,35	-	-
<i>Candida krusei</i>	7,2 ^a ± 0,26	6,7 ^b ± 0,21	6,6 ^b ± 0,25	6,92 ^c ± 0,15	-	-
<i>Candida tropicalis</i>	7 ^a ± 0,14	6,51 ^b ± 0,34	6,5 ^b ± 0,42	6,58 ^b ± 0,34	-	-

* Controle

Tabela 3 – Crescimento de biofilmes fúngicos em UFC/mL (\log_{10}) tratados com extrato glicólico de bétula em diferentes concentrações (mg/mL) durante 24 h. (n = 12). Em cada linha, médias seguidas de mesma letra não diferem significativamente ($p > 0,05$)

Fungo	Concentração do extrato em mg/mL			
	C*	25	12,5	6,25
<i>Candida albicans</i>	9,63 ^a ± 0,05	5,99 ^b ± 0,3	6,5 ^c ± 0,29	6,43 ^c ± 0,33
<i>Candida dubliniensis</i>	7,73 ^a ± 0,54	3,12 ^b ± 0,72	3,41 ^b ± 0,53	3,51 ^b ± 0,54
<i>Candida glabrata</i>	11,07 ^a ± 0,36	8,02 ^b ± 0,38	9,36 ^c ± 0,24	9,66 ^c ± 0,1
<i>Candida guilliermondii</i>	9,58 ^a ± 0,27	7,38 ^b ± 0,24	7,38 ^b ± 0,26	7,37 ^b ± 0,17
<i>Candida krusei</i>	14,09 ^a ± 0,49	9,91 ^b ± 0,28	10,23 ^{bc} ± 0,18	10,34 ^c ± 0,3
<i>Candida tropicalis</i>	10,39 ^a ± 0,48	7,77 ^b ± 0,39	8,25 ^b ± 0,42	8,15 ^b ± 0,47

* Controle

Tabela 4 – Crescimento de biofilmes bacterianos em UFC/mL (\log_{10}) tratados com extrato glicólico de bétula em diferentes concentrações (mg/mL) durante 5 min (n = 12). Em cada linha, médias seguidas de mesma letra não diferem significativamente ($p > 0,05$)

Bactéria	Concentração do extrato em mg/mL			
	C*	200	100	50
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	13,33 ^a ± 0,46	10,2 ^b ± 0,56	11,9 ^c ± 0,64	10,5 ^b ± 0,73
<i>Escherichia coli</i>	7,12 ^a ± 0,27	5,92 ^b ± 0,42	6,88 ^a ± 0,15	6,41 ^b ± 0,33
<i>Staphylococcus aureus</i>	9,79 ^a ± 0,09	9,15 ^b ± 0,22	9,3 ^b ± 0,17	9,17 ^b ± 0,2
<i>Streptococcus mutans</i>	8,6 ^a ± 0,23	8,21 ^b ± 0,4	8,23 ^b ± 0,3	8,46 ^a ± 0,41

* Controle

Tabela 5 – Crescimento de biofilmes bacterianos em UFC/mL (\log_{10}) tratados com extrato glicólico de bétula em diferentes concentrações (mg/mL) durante 24 h (n = 12). Em cada linha, médias seguidas de mesma letra não diferem significativamente ($p > 0,05$)

Bactéria	Concentração do extrato em mg/mL			
	C*	100	50	25
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	10,7 ^a ± 0,31	6,26 ^b ± 0,6	7,3 ^{bc} ± 0,17	8,98 ^{ac} ± 0,16
<i>Escherichia coli</i>	15,07 ^a ± 0,07	13,1 ^b ± 0,06	13,9 ^a ± 0,9	14,1 ^a ± 0,77
<i>Staphylococcus aureus</i>	11,42 ^a ± 0,24	5,77 ^b ± 0,35	7,7 ^c ± 0,46	8,9 ^d ± 0,26
<i>Streptococcus mutans</i>	10,36 ^a ± 0,25	6,14 ^b ± 0,27	8,2 ^c ± 0,43	8,96 ^d ± 0,18

* Controle

A redução em porcentagem dos fungos em biofilme (UFC/mL) foi acima de 58% em 5 min, sendo *C. guilliermondii* a levedura que sofreu maior redução do biofilme de 97%, e a redução foi acima de 97% em 24 h para todas as espécies de *Candida*, chegando a quase 100% para *C. dubliniensis*, *C. glabrata* e *C. krusei* (Figuras 7A a 7F)

Para as bactérias, em contato por 5 min a redução foi acima de 39,5% e atingiu 99,9% para *P. aeruginosa*. Em 24 h de contato, a redução ficou acima de 78% e conseguiu chegar a quase 100% para *P. aeruginosa*, *S. aureus* e *S. mutans* com o extrato a 100 mg/mL (Figuras 8A a 8D).

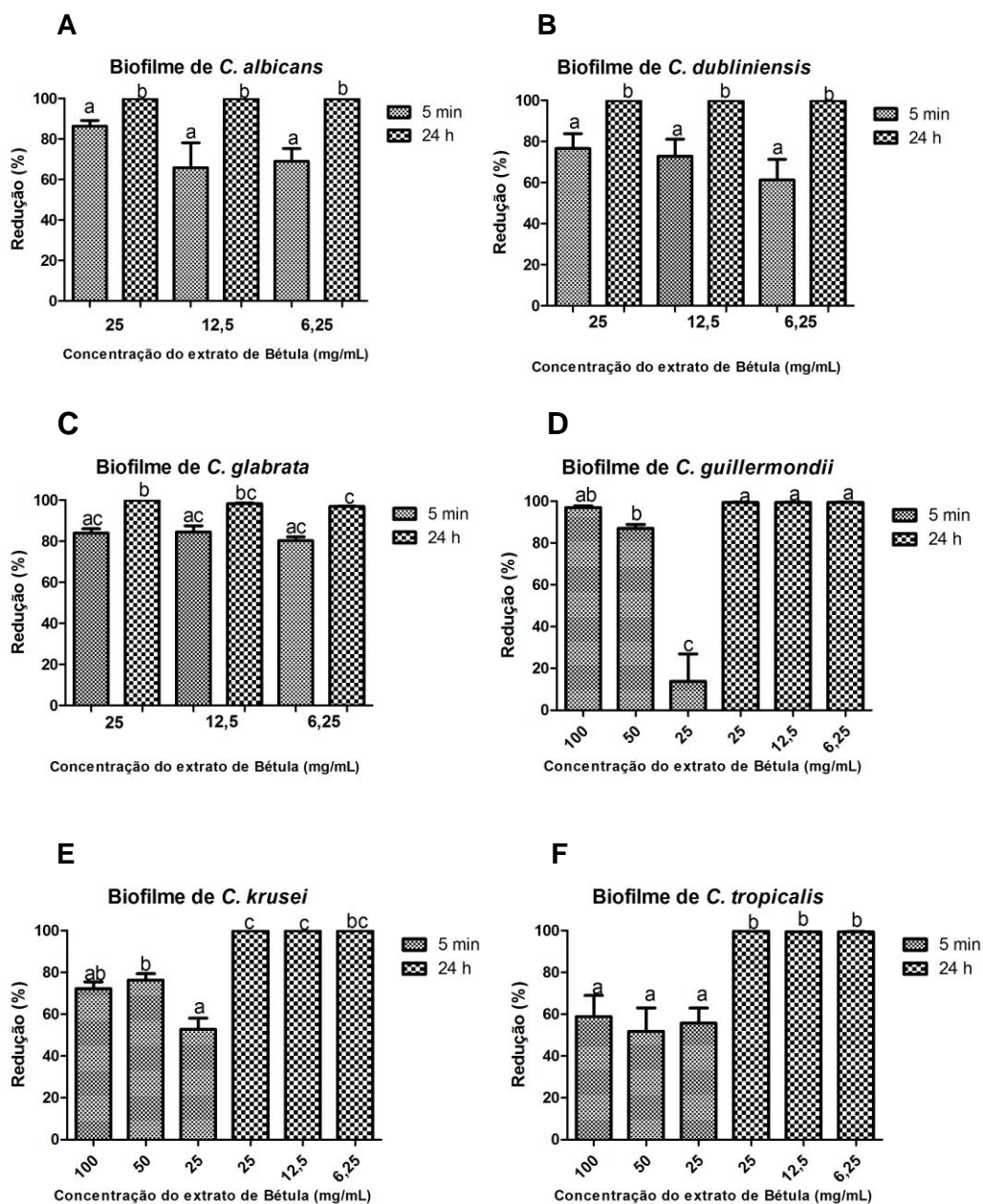


Figura 7 – Redução em porcentagem (%) em relação ao controle de UFC/mL de biofilmes fúngicos após contato de 5 min ou 24 h com o extrato de bétula em diferentes concentrações. Letras iguais não diferem significativamente ($p < 0,05$).

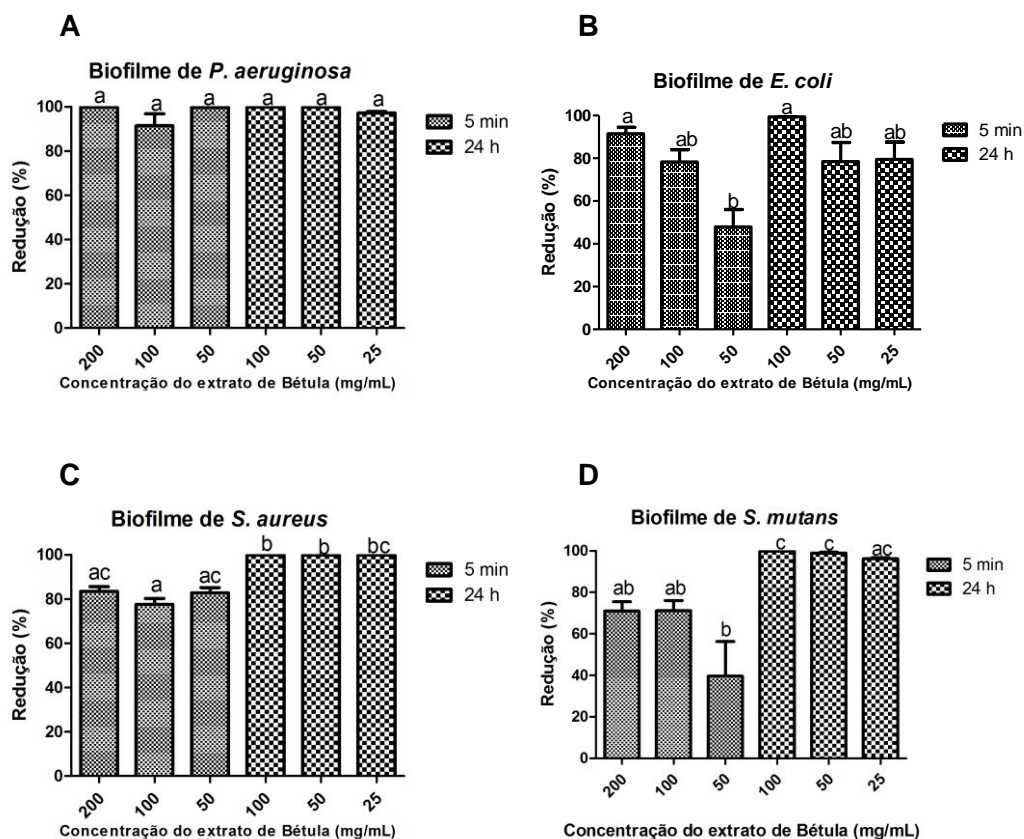


Figura 8 – Redução em porcentagem (%) em relação ao controle de UFC/mL de biofilmes bacterianos após contato de 5 min ou 24 h com o extrato de bétula em diferentes concentrações. Letras iguais não diferem significativamente ($p < 0,05$).

5.2 Citotoxicidade

Em relação à avaliação do metabolismo celular pelo método MTT, em células de fibroblasto com 5 min de exposição, as concentrações abaixo de 50 mg/mL não comprometeram a viabilidade celular dos fibroblastos, como mostra a figura 9.

Em 24 h de contato, somente a concentração de 6,25 mg/mL não foi citotóxica aos fibroblastos e a viabilidade celular não diferenciou significativamente do controle, enquanto as concentrações

acima comprometeram mais de 50% da viabilidade celular dos fibroblastos (Figura 10).

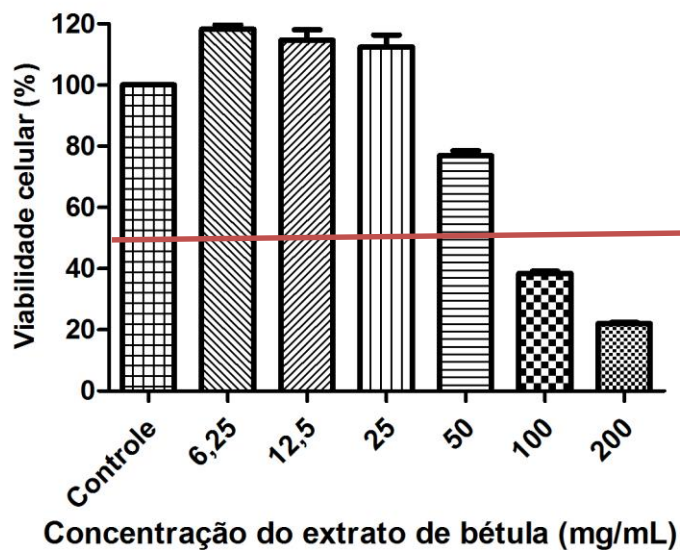


Figura 9 – Gráfico apresenta a porcentagem da viabilidade celular da linhagem FMM-1 em relação ao controle após contato de 5 min com diferentes concentrações do extrato de bétula.

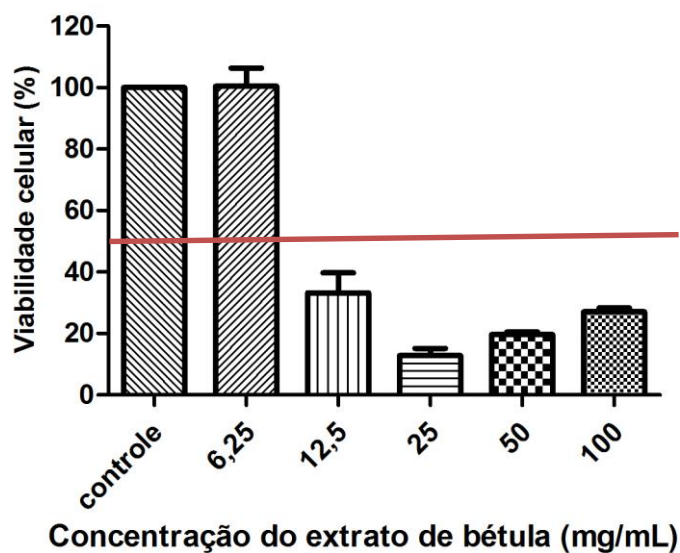


Figura 10 – Gráfico apresenta a porcentagem da viabilidade celular da linhagem FMM-1 em relação ao controle após contato de 24 h com diferentes concentrações do extrato de bétula.

Na cultura celular RAW 264.7 foi constatado que concentrações abaixo de 50 mg/mL também não comprometeram a viabilidade celular em 5 min de contato como mostra a Figura 11.

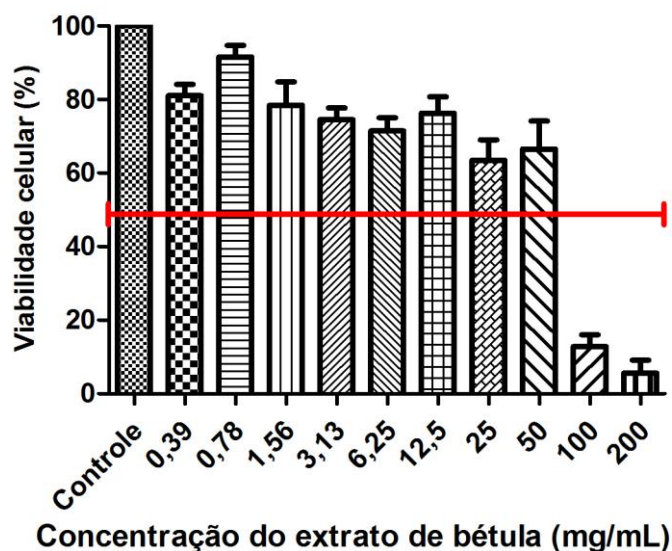


Figura 11 – Gráfico apresenta a porcentagem da viabilidade celular em relação ao controle da linhagem RAW 264.7 após contato de 5 min com diferentes concentrações do extrato de bétula.

Em contato por 24 h com o extrato, as células RAW 264.7 apresentaram alta influência em sua atividade metabólica nas diferentes concentrações do extrato, apresentando viabilidade celular superior a 50% e sem diferenciar significativamente do controle somente em concentrações abaixo de 1,56 mg/mL (Figura 12).

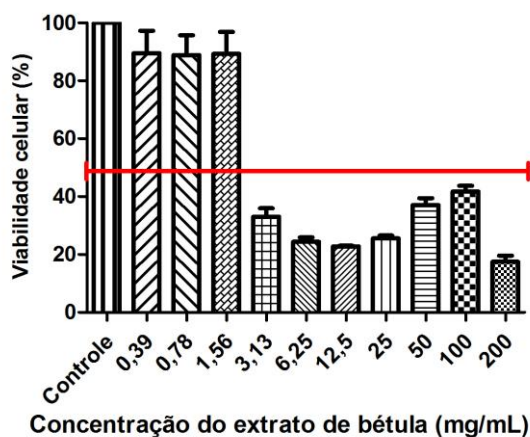


Figura 12 – Gráfico apresenta a porcentagem da viabilidade celular da linhagem RAW 264.7 após contato de 24 h com diferentes concentrações do extrato de bétula.

Para a quantificação de citocinas foram utilizadas concentrações não citotóxicas para as células RAW 264.7, verificada no ensaio de metabolismo celular pelo método MTT. Em 5 min de contato nas concentrações de 50 e 25 mg/mL do extrato os níveis de IL-1 β e TNF- α não tiveram diferença estatística em relação ao controle ($p > 0,05$), enquanto na concentração de 12,5 mg/mL a produção de ambas citocinas foi menor, como mostra a comparação presente na Tabela 6.

Tabela 6 – Quantificação de IL-1 β e TNF- α (pg/mL) produzida por RAW 264.7 após contato de 5 min com diferentes concentrações do extrato de bétula. Em cada coluna, médias seguidas por mesma letra não diferem significativamente ($p > 0,05$)

Concentração (mg/mL)	IL-1 β	TNF- α
50	2,61 \pm 0,65 ^a	255,27 \pm 34,01 ^a
25	3,38 \pm 1,68 ^a	358,68 \pm 52,38 ^a
12,5	0,25 \pm 0,79 ^b	109,89 \pm 57,41 ^b
Controle	4,9 \pm 1,48 ^a	293,24 \pm 152,29 ^a

No tratamento de 24 h, foram utilizadas concentrações menores que em 5 min, as quais não provocaram citotoxicidade nos macrófagos. Verificou-se que a produção de IL-1 β não diferiu significativamente entre os grupos tratados e o controle ($p > 0,05$) e o nível de TNF- α não diferiu significativamente entre os grupos controle e tratados nas concentrações de 0,39 e 0,78 mg/mL, mas foi estimulado na concentração de 1,56 mg/mL, conforme Tabela 7.

Tabela 7 – Quantificação de IL-1 β e TNF- α (pg/mL) produzida por RAW 264.7 após contato de 24 h com diferentes concentrações do extrato de bétula. Em cada coluna, médias seguidas por mesma letra não diferem significativamente ($p > 0,05$)

Concentração (mg/mL)	IL-1 β	TNF- α
1,56	7,76 \pm 5,21 ^a	1568,72 \pm 289,78 ^b
0,78	2,53 \pm 5,28 ^a	548,06 \pm 85,05 ^a
0,39	0 ^a	537,9 \pm 30,43 ^a
Controle	0 ^a	577,07 \pm 191,38 ^a

5.3 Genotoxicidade

A genotoxicidade do extrato de bétula foi realizada por meio da contagem de micronúcleos (Figura 13). Foram escolhidas concentrações maiores: 100, 50 e 25 mg/mL, e concentrações menores: 3,13, 1,56 e 0,78 mg/mL do extrato de bétula. Em todas as concentrações, o número de micronúcleo foi semelhante ao grupo controle (Tabela 8).

Tabela 8 – Contagem de micronúcleos (MN) por mil núcleos em duplicata

Concentração do extrato (mg/mL)	Controle	0,78	1,56	3,13	25	50	100
MN/1000 núcleos	1	4	3	4	4	3	2

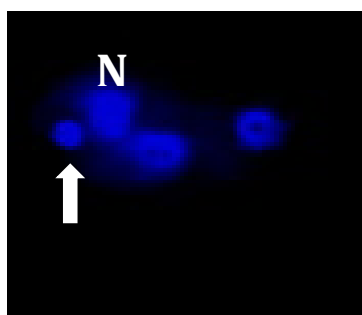


Figura 13 – Microscopia óptica de fluorescência de células RAW264.7 coradas por DAPI evidenciando os núcleos (N) e o micronúcleo (seta). Aumento 800 x.

5.4 Atividade anti-inflamatória

Em 5 min de tratamento, a cultura de RAW 264.7 estimulada com LPS produziu quantidade que não foi diferente significativamente ($p > 0,05$) de IL-1 β nos grupos tratados com extrato de bétula nas concentrações de 50 e 25 mg/mL e no grupo controle. Contudo, houve significativa redução da produção de IL- β no grupo tratado com 12,5 mg/mL do extrato (Tabela 9).

Com relação à produção de TNF- α pelos macrófagos, todas as concentrações analisadas do extrato (50, 25 e 12,5 mg/mL) promoveram significativa redução em relação ao controle (LPS), sendo que a concentração de 12,5 mg/mL promoveu maior redução na produção desta citocina (Tabela 9).

Considerando a concentração 12,5 mg/mL como a que apresentou melhores resultados quanto à diminuição da produção de citocinas pró-inflamatórias (IL-1 β e TNF- α), nesta concentração foi quantificada também a citocina anti-inflamatória IL-10, a qual não diferenciou significativamente entre os grupos tratado e o controle LPS (Tabela 9).

Tabela 9 – Quantificação de IL-1 β e TNF- α (pg/mL) produzida por RAW 264.7 após contato de 5 min com diferentes concentrações do extrato de bétula na presença de LPS. Em cada coluna, médias seguidas por mesma letra não diferem significativamente ($p > 0,05$)

Concentração (mg/mL)	IL-1 β	TNF- α	IL-10
50	3,59 \pm 1,07 ^a	766,05 \pm 111,79 ^b	-
25	2,83 \pm 1,0 ^{ab}	815,06 \pm 351,18 ^b	-
12,5	1,24 \pm 1,76 ^b	238,95 \pm 42,36 ^c	127,61 \pm 24,74 ^a
Controle	4,44 \pm 1,44 ^a	2623,61 \pm 725,6 ^a	117,27 \pm 57,35 ^a

Quanto à produção de óxido nítrico (ON), as concentrações de 12,5 e 25 mg/mL não diferenciaram significativamente do controle (LPS), enquanto que em 50 mg/mL a liberação de ON foi estatisticamente menor ($p < 0,05$) que no grupo controle LPS (Figura 14).

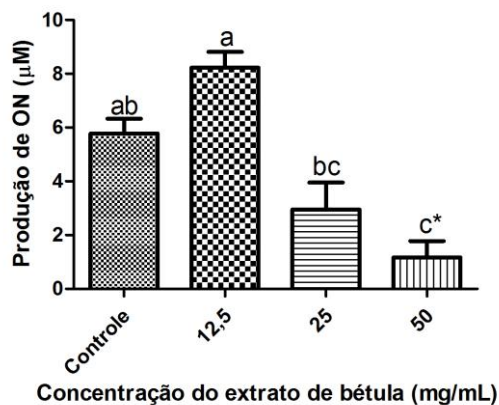


Figura 14- Quantificação da produção de ON nos grupos tratados e controle em 5 min estimulados por LPS. N=10. Letras iguais correspondem a grupos homogêneos ($p > 0,05$). * Diferença significativa em comparação ao controle ($p < 0,05$).

No tratamento de 24 h, observou-se que a cultura RAW 264.7 estimulada por LPS em todos os grupos tratados aumentou significativamente ($p < 0,05$) a produção de IL-1 β em relação ao grupo controle (DMEM + LPS). No entanto, houve redução estatisticamente significativa na produção de TNF- α nos grupos tratados com diferentes concentrações do extrato de bétula (1,58, 0,78 e 0,39 mg/mL) em relação ao controle LPS ($p < 0,05$). Com relação à produção da citocina IL-10, observou redução significativa no grupo tratado pelo extrato de bétula na concentração 0,78 mg/mL em relação ao grupo controle LPS (Tabela 10).

Tabela 10 – Quantificação de IL-1 β e TNF- α (pg/mL) produzida por RAW 264.7 após contato de 24 h com diferentes concentrações do extrato de bétula. Em cada coluna, médias seguidas por mesma letra não diferem significativamente ($p > 0,05$)

Concentração (mg/mL)	IL-1 β	TNF- α	IL-10
1,56	43,43 \pm 17,36 ^b	2686,88 \pm 369,73 ^c	-
0,78	50,72 \pm 12,24 ^b	2882,25 \pm 400,75 ^c	552,22 \pm 99,86 ^b
0,39	44,15 \pm 10,88 ^b	3439,15 \pm 396,8 ^b	-
Controle	26,23 \pm 4,16 ^a	21407,48 \pm 299,53 ^a	2451,3 \pm 24,74 ^a

Em adição, foi notado que a produção de ON foi menor estatisticamente ($p > 0,05$) em todos os grupos tratados com o extrato de bétula em relação ao grupo controle LPS (Figura 15).

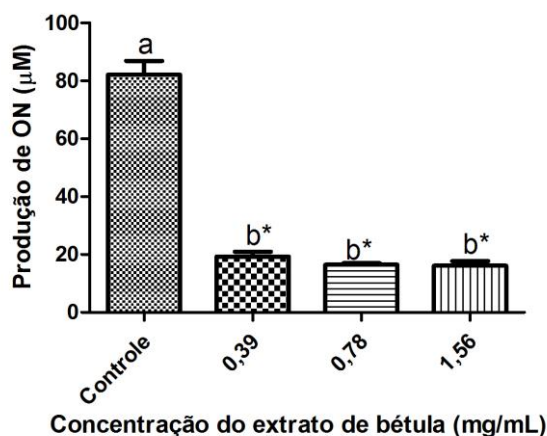


Figura 15 – Quantificação da produção de ON nos grupos tratados e controle em 24 h estimulados por LPS. N = 10. Letras iguais correspondem a grupos homogêneos ($p > 0,05$). * Diferença significativa em comparação ao controle ($p < 0,05$).

Para relacionar todos as variáveis avaliadas quanto à atividade anti-inflamatória, as tabelas 11 e 12 indicam as alterações na

quantificação de citocinas e ON nos grupos tratados em relação ao grupo controle LPS em 5 min e 24 h de contato.

Tabela 11 - Comparação da quantificação das citocinas e ON nos grupos tratados em relação ao grupo controle em 5 min estimulados com LPS. Quantificação ↑ maior, ↓ menor e = semelhante ao do controle

Concentração (mg/mL)	IL-1 β	TNF- α	IL-10	ON
50	=	↓	-	↓
25	=	↓	-	=
12,5	↓	↓	=	=

Tabela 12 - Comparação da quantificação das citocinas e ON nos grupos tratados em relação ao grupo controle em 24 h estimulados com LPS. Quantificação ↑ maior e ↓ menor ao do controle

Concentração (mg/mL)	IL-1 β	TNF- α	IL-10	ON
1,56	↑	↓	-	↓
0,78	↑	↓	↓	↓
0,39	↑	↓	-	↓

6 DISCUSSÃO

Para avaliação da atividade antimicrobiana, este estudo analisou os efeitos do extrato glicólico de bétula sobre dez espécies de micro-organismos de interesse médico e odontológico, sendo seis espécies de *Candida* e quatro espécies de bactérias. Foi verificado que para as espécies de *Candida*, o extrato foi capaz de eliminar culturas planctônicas em concentrações entre 3,13 e 6,25 mg/mL (Tabela 1). A ação antifúngica do extrato também foi evidenciada nos biofilmes maduros, os quais sofreram significativas reduções, como mostram as Figuras 7A a 7F.

Entre os efeitos em biofilmes fúngicos, destaca-se a ação contra *C. albicans* que em contato por 5 min apresentou redução de UFC/mL de até $86,4 \pm 9,9\%$ e em contato por 24 h houve redução acima de 99,9% em todas as concentrações testadas. Este fato é relevante visto que *C. albicans* é responsável por cerca de 50 a 60% das candidoses invasivas (Tsai et al., 2013). Outros trabalhos também relataram efeito antifúngico de plantas sobre biofilme de *C. albicans*, como o estudo de Jesus et al. (2015) que evidenciou redução significativa do biofilme a partir da concentração de 50 mg/mL do extrato glicólico de *Persea americana* em 5 min de contato, assim como o de Oliveira JR et al. (2014) com o extrato glicólico de *Arctium lappa* L. A 250 mg/mL e o estudo de Oliveira SA et al. (2014) que obteve eliminação de *C. albicans* em biofilmes mistos tratados por 5 min com óleos essenciais de *C. limonum* e *C. aurantium*. Estes estudos indicam o potencial das plantas no tratamento de infecções causadas por *C. albicans*.

O efeito antifúngico do extrato de bétula também foi notório em espécies de *Candida* não-*albicans*, cujas reduções do biofilme

em 24 h de tratamento passou dos 99% para todas as espécies, sendo que para *C. dubliniensis*, *C. glabrata* e *C. krusei* este percentual ficou acima dos 99,99% e em 5 min a redução foi superior a 58% (*C. tropicalis*) e atingiu 97% para *C. guilliermondii*. Estas espécies, assim como *C. albicans*, são patógenos oportunistas, com potencial de causar candidoses e/ou infecções sistêmicas em humanos (Sullivan et al., 2005; Colombo et al., 2007; Rodrigues et al., 2014; Papon et al., 2013; Schuster et al., 2013).

Outros extratos vegetais foram testados sobre espécies de *Candida*, como *Buchenavia tomentosa* cuja ação antifúngica foi observada sobre *C. albicans*, *C. dubliniensis*, *C. glabrata*, *C. krusei*, *C. tropicalis* e *C. parapsilosis* (Teodoro et al., 2015). Samie et al. (2010) analisaram a ação antifúngica de extratos de 30 espécies de plantas contra *C. albicans* e *C. krusei*, sendo que 15 foram efetivos contra *C. albicans* e 12 contra *C. krusei*. Também Höfling et al. (2010) avaliaram a ação antifúngica de cinco extratos vegetais sobre dez espécies de *Candida*, incluindo as seis testadas no presente estudo, as quais apresentaram sensibilidade a todas as plantas testadas.

Um dos poucos os estudos encontrados na literatura que avaliam a ação antifúngica de fitoterápicos sobre biofilmes de *Candida* não-*albicans* é o estudo de Pires et al. (2011), que descreveu a ação do óleo essencial de canela contra biofilmes de *C. parapsilosis* e *C. orthopsilosis*. Diante deste cenário, na prospecção de plantas com ação antifúngica, há a necessidade de explorar mais seus efeitos sobre o biofilme, pois sabe-se que a formação do biofilme tem um papel importante na patogenicidade dos fungos (Martinez, Friez, 2010).

Um dos principais fatores de virulência das espécies de *Candida* é a capacidade de aderir ao substrato e formar biofilme (Silva et al., 2012). Em biofilmes, os fungos se tornam menos susceptíveis aos agentes antimicrobianos, devido a diferentes fatores como a formação de uma matriz extracelular que protege as células de agentes externos, alta

densidade celular em biofilmes maduros, cooperação metabólica entre as células e regulação da expressão gênica a fim de aumentar a resistência aos quimioterápicos (Ramage et al., 2012). Em biofilme, *C. albicans* pode ser até mil vezes mais resistente ao fluconazol que em sua forma livre (Uppuluri et al., 2008).

Desse modo, considerando os resultados do presente estudo, o extrato de bétula mostrou ser eficaz contra esses fatores presentes no biofilme que conferem proteção às espécies de *Candida*. Estudos mais aprofundados são necessários para elucidar os mecanismos de ação utilizados por este extrato para penetrar no biofilme já formado e agir contra as células fúngicas.

São raros os estudos sobre os efeitos de *B. pendula* em espécies de *Candida* e outros fungos. Em 2007, Välimaa et al. relataram a inibição de 49% no crescimento planctônico de *C. albicans* e de 15% em *S. cerevisiae* na presença do extrato da casca de *B. pendula*. Encontram-se mais estudos sobre ação antifúngica de outras espécies de *Betula* (Jones et al., 2000; Omar et al., 2000; Webster et al., 2008).

Em relação ao efeito antimicrobiano nas bactérias, em *P. aeruginosa* o extrato foi bacteriostático a 12,5 mg/mL e bactericida a 25 mg/mL. Para outras bactérias, *E. coli*, *S. aureus* e *S. mutans*, não foi possível determinar a CIMs e CMMs nas concentrações testadas (Tabela 1), porém pode-se observar redução do crescimento bacteriano nas diferentes concentrações do extrato (Figura 6). Assim como neste estudo, utilizando o método de diluição em caldo, Duric et al. (2013) relataram inibição do crescimento de *P. aeruginosa* a 1,25% do extrato metanólico de folhas de bétula e não obtiveram inibição do crescimento de *E. coli*. Porém, neste mesmo estudo eles constataram também a inibição do crescimento de *S. aureus* a 2,5% do extrato.

Todavia, o extrato glicólico de bétula provocou ação antimicrobiana com redução satisfatória em todos biofilmes bacterianos, sendo *P. aeruginosa* a mais sensível ao tratamento, com redução de até

99,9% em 5 min e acima de 99,99% em 24 h (Figuras 8A a 8D). De acordo com Mesaros et al. (2007), *P. aeruginosa* apresenta mecanismos intrínsecos de resistência aos agentes antimicrobianos como baixa permeabilidade de parede celular, bomba de efluxo com especificidade para um amplo espectro de substrato e a produção de enzima β -lactamase AmpC, conferindo-lhe resistência a antibióticos β -lactâmicos, como a penicilina. Além disso, segundo Strateva e Yordanov (2009), observa-se em *P. aeruginosa* facilidade de adquirir mecanismos de defesa adicionais. Diante dessas características de *P. aeruginosa*, o extrato de bétula se mostra como uma alternativa ao controle deste micro-organismo, já que mostrou ser capaz de quase eliminar seu crescimento *in vitro*.

A evidência da ação do extrato sobre o biofilme maduro de *E. coli* apresentada neste estudo complementa os resultados do estudo de Wojnicz et al. (2012), os quais mostraram que o extrato aquoso de *B. pendula* diminuiu a mobilidade de *E. coli* e reduziu a formação de biofilme, porém discorda do estudo de Samoiloova et al. (2014) que embora descreveu a redução da mobilidade de *E. coli* por *B. pendula*, relata que o extrato aquoso desta planta favoreceu a formação de biofilme de *E. coli*.

As bactérias testadas no presente estudo são de importância médica e odontológica. Embora, tenham sido utilizadas cepas de referência, essas espécies podem apresentar cepas ou sorotipos altamente virulentas e/ou resistentes a antibiótico. Em 2011, *E. coli* O104:H4 causou a morte de 53 pessoas por hemorragia gastrointestinal na Alemanha (Radosavljevic et al., 2015). O sorotipo *E. coli* O157 tem sido responsável por diversos casos de infecção alimentar na Europa e EUA desde a década de 80 (Pennington, 2014).

S. aureus, conhecido por ser um micro-organismo comensal da nosofaringe e pele do ser humano, pode invadir partes internas do corpo e causar doenças como fasciite necrosante,

endocardites e pneumonia (Otto, 2010). Além disso, devido ao uso indiscriminado de antibióticos, vem aumentando o surgimento de cepas de *S. aureus* resistente à meticilina (MRSA), cuja infecção causa 20% de mortalidade (Klevens et al., 2007). A eficiência do extrato de bétula sobre estas espécies de bactérias sugere potencial também para o tratamento dessas cepas mais danosas à saúde, sendo de interesse avaliar seus efeitos sobre tais cepas resistentes, de forma isolada ou em associação com antibióticos.

O efeito antimicrobiano do extrato de bétula sobre biofilme de *S. mutans* também é relevante, visto que este micro-organismo pode ser naturalmente encontrado no biofilme dental (Sato et al., 2015), cuja a associação com outros fatores favorece a formação de cárie. Em 5 min de contato, que é um tempo aproximado da ação do enxaguatório bucal, considerando o tempo de bochecho e ação residual, o extrato foi capaz de reduzir até 70% do biofilme de *S. mutans*, o que indica a possibilidade deste extrato ser acrescentado em enxaguatórios bucais como composto principal ou adjuvante na prevenção e tratamento da cárie.

Alguns compostos bioativos encontrados em extratos de *B. pendula* podem ser responsáveis por sua ação antimicrobiana, uma vez que em estudos prévios demonstraram ter efeito contra alguns micro-organismos, como o ácido oleanólico que mostrou ter ação contra *S. aureus* e *B. subtilis* (Duric et al., 2013), a betulina com ação antifúngica sobre *Fusarium oxysporium* (Cota et al., 2003) e o ácido betulínico que apresentou ação antimicrobiana contra bactérias Gram-positivas (Schühly et al., 1999).

Os efeitos antimicrobianos do extrato de bétula encontrados neste estudo endossam o uso popular desta planta em infecções bacterianas relatado em levantamento etnobotânico realizado em Montenegro (Menkovic et al., 2011).

Outra indicação mais comumente associada a *B. pendula* em estudos etnobotânicos é o tratamento de quadros inflamatórios, como

em infecções renais e reumatismos (Havlik et al., 2010; Saric-Kundalic et al., 2010), inflamação do trato urinário (Menkovic et al., 2011) e artrose (Agelet, Vallès, 2003). Diante dessa propriedade farmacológica atribuída à bétula, este estudo avaliou também a capacidade desta planta em modular *in vitro* a produção de citocinas pró-inflamatórias (IL-1 β e TNF- α) e anti-inflamatória (IL-10) e a produção de óxido nítrico em cultura de macrófagos de camundongo (RAW 264.7).

O processo inflamatório foi induzido pela adição de LPS na cultura celular e as concentrações testadas não comprometeram a viabilidade celular das células RAW 264.7, o que afirma que as ocorrências sejam devido à ação do extrato e não a sua citotoxicidade. Em contato por 5 min, houve redução no nível de IL-1 β na concentração de 12,5 mg/mL. Entretanto, em contato por 24 h houve maior aumento desta citocina nos grupos tratados, embora observou-se que o LPS estimulou a produção de IL-1 β de forma contida em todos os grupos, permanecendo em baixo nível.

Por outro lado, o extrato de bétula promoveu significativa inibição da produção de TNF- α em todas as concentrações, alcançando 91% de redução em 5 min e 87% em 24 h de contato. TNF- α está envolvida com a ativação de cascatas de eventos que induz a produção de outras citocinas e moléculas moduladoras do processo inflamatório (Paul et al., 2006), por isso é considerada uma das principais citocinas pró-inflamatórias.

Outro efeito do extrato de bétula foi a menor quantificação de óxido nítrico, de até 80% de redução em relação ao controle (LPS) em ambos tempos de contato, o que pode estar também relacionado ao menor nível de TNF- α , uma vez que esta citocina tem influência na síntese de ON (Paul et al., 2006). O óxido nítrico é um importante mediador de diversas ações biológicas como a vasodilatação, neurotransmissão e inibição da adesão e agregação de plaquetas (Chan et al., 2015). Contudo, a superprodução de óxido nítrico pode acelerar o

processo inflamatório ao promover produção de citocinas e mediar funções de células no sítio da inflamação (Chen X et al., 2015).

Quanto à produção de IL-10, em 5 min o extrato manteve esta citocina em nível semelhante ao controle (LPS) porém em 24 h sua quantificação foi menor. A IL-10 é amplamente denominada como citocina anti-inflamatória por estar associada a regulação do processo inflamatório, sendo capaz de suprimir alguns mediadores pró-inflamatórios (Asadullah et al., 2003).

A atividade anti-inflamatória de *B. pendula* tem sido avaliada por diferentes modos de ação. Gründemann et al. (2011) relataram o efeito anti-inflamatório de *B. pendula* por meio da inibição do crescimento e divisão celular de linfócitos ativados. Tunón et al. (1995) demonstraram que o extrato aquoso de bétula inibiu a síntese de prostaglandinas e fator ativador de plaquetas (PAF). Wacker et al. (2012) evidenciaram que o extrato de bétula causou inibição da proliferação de células T *in vitro* e *in vivo*, no qual também retardou o aparecimento da opacificação da córnea.

Tem sido comprovado que alguns dos fitocompostos de bétula, como taninos, outros polifenóis e polissacarídeos tem capacidade modulatória na inflamação (Tunón et al., 1995; Yi et al., 2010; Ligacheva et al., 2014; Wacker et al., 2012). O estudo de Yi et al. (2010) mostrou que o ácido betulínico proporcionou diminuição significativa dos níveis séricos de interleucinas pró-inflamatórias, como IL-2 e IL-6, porém não afetou os níveis da citocina anti-inflamatória IL-10, em camundongos. Em adição, os autores também comprovaram que este biocomposto apresentou a capacidade de inibir *in vitro* a síntese de TNF- α por macrófagos peritoneais murinos estimulados com LPS.

Ligacheva et al. (2014) mostraram a capacidade imunomoduladora de polissacarídeos extraídos de *B. pendula* por meio de sua influência na cascata de sinalização em macrófagos ativados por LPS. Estes estudos mostram que *B. pendula* e seus compostos têm

apresentado resultados promissores na modulação do processo inflamatório.

Quanto à citotoxicidade, as concentrações que apresentaram atividade anti-inflamatória não comprometeram a viabilidade celular. Contudo, alerta-se para as concentrações com atividade antimicrobiana, já que em 5 min concentrações acima de 100 mg/mL apresentaram citotoxicidade nas duas linhagens celulares analisadas (fibroblastos gengivais humanos e macrófagos de camundongo) e em 24 h somente concentrações abaixo de 6,25 e 1,56 mg/mL em fibroblastos e macrófagos de camundongo, respectivamente, não diferenciaram significativamente a viabilidade celular em relação ao controle. Entretanto, estudos *in vivo* são necessários para analisar a capacidade do organismo em repor as células afetadas.

Para finalizar, a avaliação da genotoxicidade foi realizada pela contagem de micronúcleos. Os micronúcleos são importantes biomarcadores de genotoxicidade, porque são fragmentos de material genético separados do núcleo, formados durante a telófase da mitose ou meiose em consequência de danos cromossômicos sofridos pela exposição a agentes externos (Araldi et al., 2015).

Os resultados mostraram que o extrato de bétula não alterou a contagem de micronúcleos, mesmo as concentrações que previamente demonstraram citotoxicidade (100, 50 e 25 mg/mL) não foram capazes de alterar a integridade nuclear em 24 h de contato. Este dado é importante visto que a avaliação da genotoxicidade é exigência da ANVISA para validação de novos fármacos (Brasil, 2010).

Sabe-se que em infecções orais entre outras, os micro-organismos e seus produtos metabólicos estimulam também quadros inflamatórios. Como visto no presente estudo, *B. pendula* tem ação contra diversos micro-organismos e também na modulação inflamatória com redução de TNF- α e ON.

Sendo assim, este estudo permite inferir que *B. pendula* tem potencial de ser utilizada na elaboração de produtos de uso médico-odontológico para tratamento de doenças infecciosas e inflamatórias. Além disso, seus biocompostos poderiam também ser adicionados em formulações já existentes no intuito de intensificar as ações antimicrobiana e anti-inflamatória destes fármacos.

7 CONCLUSÃO

O extrato glicólico de *B. pendula* apresentou importante atividade anti-biofilme sobre todas as espécies bacterianas e fúngicas avaliadas neste estudo. Mostrou também atividade anti-inflamatória por meio da redução de TNF- α e ON. Manteve a viabilidade celular na maioria das concentrações em contato por 5 min e em concentrações baixas em 24 h e não apresentou ação genotóxica.

8 REFERÊNCIAS*

Agelet A, Vallès J. Studies on pharmaceutical ethnobotany in the region of Pallars (Pyrenees, Catalonia, Iberian Peninsula). Part II. New or very rare uses of previously known medicinal plants. *J Ethnopharmacol.* 2003 Feb;2(3):211-27.

Agyare C, Koffuor GA, Boakye YD, Mensah KB. Antimicrobial and anti-inflammatory properties of *Funtumia elastica*. *Pharm Biol.* 2013 Apr;51(4):418-25. doi: dx.doi.org/10.3109/13880209.2012.738330.

Albuquerque ACL, Pereira MSV, Silva DF, Pereira LF, Viana FAC, Higino JS, et al. The anti-adherence effect of *Lippia sidoides* Cham. Extract against microorganisms of dental biofilm. *Rev Bras PI Med.* 2013;15(1):41-6. doi: dx.doi.org/10.1590/S1516-05722013000100005.

Al-Dhabi NA, Arasu MV, Rejiniemon TS. *In vitro* antibacterial, antifungal, antibiofilm, antioxidant, and anticancer properties of isosteviol isolated from endangered medicinal plant *Pittosporum tetraspermum*. *Evid-Bas Complem and Altern Med.* [Internet]. 2015: [acesso em: 10 out 2015] [11 p.]. Disponível em: <http://www.hindawi.com/journals/ecam/2015/164261/>. doi: dx.doi.org/10.1155/2015/164261.

Al-Massarani S, El-Dib R. *In vitro* evaluation of cytotoxic and antimicrobial potentials of the Saudi traditional plant *Alhagigrae corumboiss*. *Pak J Pharm Sci.* 2015 May;28(3 Suppl):1079-86.

Anes J, McCusker MP, Fanning S, Martins M. The ins and outs of RND efflux pumps in *Escherichia coli*. *Front Microb.* [Internet]. 2015; [acesso em: 23 set 2015] 6: [14 p.]. Disponível em: <http://journal.frontiersin.org/article/10.3389/fmicb.2015.00587/full>

* Baseado em: International Committee of Medical Journal Editors Uniform Requirements for Manuscripts Submitted to Biomedical journals: Sample References [Internet]. Bethesda: US NLM; c2003 [atualizado 20 ago 2013; acesso em 25 out 2014]. U.S. National Library of Medicine; [about 6 p.]. Disponível em: http://www.nlm.nih.gov/bsd/uniform_requirements.html

Araldi RP, de Melo TC, Mendes TB, de Sá Júnior PL, Nozima BHN, Ito ET, et al. Using the comet and micronucleus assays for genotoxicity studies: A review. *Biomed Pharmacother.* 2015 May;72:74–82. doi: [dx.doi.org/10.1016/j.biopha.2015.04.004](https://doi.org/10.1016/j.biopha.2015.04.004).

Asadullah K, Sterry W, Volk HD. Interleukin-10 therapy—review of a new approach. *Pharmacol Rev.* 2003 Jun; 55(2):241–69.

Brasil. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução da Diretoria Colegiada nº 48, de 16 de Março de 2004. Dispõe sobre registro de medicamentos fitoterápicos. *Diário Oficial da União* 18 mar 2004.

Brasil. Ministério da Saúde Política Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos [internet]. Brasília: Ministério da Saúde; 2006 [acesso em 14 nov 2015]. Disponível em: http://bvsmis.saude.gov.br/publicacoes/politica_nacional_fitoterapicos.pdf

Brasil. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Guia para a condução de estudos não clínicos de segurança necessários ao desenvolvimento de medicamentos: gerência de avaliação de segurança e eficácia [internet]. Brasília: Ministério da Saúde; 2010 [acesso em 20 nov 2015]. Disponível em:

<http://portal.anvisa.gov.br/wps/wcm/connect/30dd7a0047457fa68b53df3bc4c6735/GUIA+PARA+A+CONDU%C3%87%C3%83O+DE+ESTUDOS+N%C3%83O+CL%C3%8DNICOS+DE+SEGURAN%C3%87A+NECESS%C3%81RIOS+AO+DESENVOLVIMENTO+DE+MEDICAMENTOS.pdf?MOD=AJPERES>

Brown S, Santa Maria JP Jr, Walker S. Wall teichoic acids of Gram-positive bacteria. *Ann Rev Microbiol.* 2013;67:313-36. doi: [dx.doi.org/10.1146/annurev-micro-092412-155620](https://doi.org/10.1146/annurev-micro-092412-155620).

Burnside K, Rajagopal L. Aspects of eukaryotic-like signaling in Gram-positive cocci: a focus on virulence. *Future Microbiol.* 2011 Jul;6(7):747–61. doi: [dx.doi.org/10.2217/fmb.11.62](https://doi.org/10.2217/fmb.11.62).

Chan P-M, Tan Y-S, Chua K-H, Sabaratnam V, Kuppusamy UR. Attenuation of inflammatory mediators (TNF- α and nitric oxide) and up-regulation of IL-10 by wild and domesticated basidiocarps of *Amauroderma rugosum* in LPS-stimulated RAW264.7 cells. *PLoS One* [Internet]. 2015 Oct;10(10): e0139593. doi: [dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0139593](https://doi.org/10.1371/journal.pone.0139593).

Chen HF, Lan CY. Role of SFP1 in the regulation of *Candida albicans* biofilm formation. *Plos One.* 2015 Jun;10(6): e0129903. doi: [dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0129903](https://doi.org/10.1371/journal.pone.0129903).

Chen X, Miao J, Wang H, Zhao F, Hu J, Gao P, et al. The anti-inflammatory activities of *Ainsliaea fragrans* Champ. extract and its components in lipopolysaccharide-stimulated RAW264.7 macrophages through inhibition of NF- κ B pathway. *J Ethnopharmacol.* 2015 Jul 21;170:72–80. doi: dx.doi.org/10.1016/j.jep.2015.05.004.

Clinical and Laboratory Standards Institute. Reference methods for broth dilution antifungal susceptibility testing of yeast: fourth informational supplement. Wayne: CLSI; 2012. 30p.

Cockerill III FR, Wikler MA, Alder J, Dudley MN, et al. Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically: approved standard. CLSI. 2012;32(2).

Colombo AL, Guimarães T, Silva LRBF, Monfardini LPDA, Cunha AKB, Rady P, Alves T, et al. Prospective observational study of candidemia in São Paulo, Brazil: incidence rate, epidemiology, and predictors of mortality. *Infect Control Hosp Epidemiol.* 2007 May;28(5):570-6.

Cota BB, Oliveira AB, Souza-Filho JD, Braga FC. Antimicrobial activity and constituents of *Coccoloba acrostichoides*. *Fitoterapia.* 2003 Dec;74(7-8):729–31.

Czarny TL, Perri AL, French S, Brown ED. Discovery of novel cell wall-active compounds using PywaC, a sensitive reporter of cell wall stress, in the model Gram-positive bacterium *Bacillus subtilis*. *Antimicrob Agents Chemother.* 2014 Jun;58(6):3261-9. doi: dx.doi.org/10.1128/AAC.02352-14.

Dehelean CA, Soica C, Ledeti I, Aluas M, Zupko I, Găluscan A, et al. Study of the betulin enriched birch bark extracts effects on human carcinoma cells and ear inflammation. *Chem Cent J.* 2012 Nov 19;6(1):137. doi: dx.doi.org/10.1186/1752-153X-6-137.

Demirci B, Paper DH, Demirci F, Baser KHC, Franz G. Essential oil of *Betula pendula* Roth buds. *Evid Based Complement Alternat Med.* 2004 Dec;1(3):301–3.

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

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

Donia AE, Soliman GA, El-Sakhawy MA, Yusufoglu H, Zaghloul AM. Cytotoxic and antimicrobial activities of *Emex spinosa* (L.) Campd. extract. Pak J Pharm Sci. 2014 Mar;27(2):351-6.

Duric K, Kovac-Besovic E, Niksic H, Sofic E. Antibacterial activity of methanolic extracts, decoction and isolated triterpene products from different parts of birch, *Betula pendula*, Roth. J Plant Stud. 2013;2(2):61-70. doi: dx.doi.org/10.5539/jps.v2n2p61.

Espina L, Pagán R, López D, García-Gonzalo D. Individual constituents from essential oils inhibit biofilm mass production by multi-drug resistant *Staphylococcus aureus*. Molecules. 2015 Jun 19;20:11357-72. doi: dx.doi.org/10.3390/molecules200611357.

Ferreira GLS, Pérez ALAL, Rocha IM, Pinheiro MA, Castro RD, Carlo HL, et al. Does scientific evidence for the use of natural products in the treatment of oral candidiasis exist? A systematic review. Evid Based Complement Alternat Med. 2015;2015:147804. doi: dx.doi.org/10.1155/2015/147804.

Fidel PL Jr, Vazquez JA, Sobel JD. *Candida glabrata*: Review of epidemiology, pathogenesis, and clinical disease with comparison to *Candida albicans*. Clin Microbiol Rev. 1999 Jan;12(1):80-96.

Galan JC, Gonzales-Candelas F, Rolain JM, Canton R. Antibiotics as selectors and accelerators of diversity in the mechanisms of resistance: From the resistome to genetic plasticity in the β -lactamases world. Front Microbiol. 2013 Feb 8;4:9. doi: dx.doi.org/10.3389/fmicb.2013.00009.

Gerber JS, Coffin SE, Smathers SA, Zaoutis TE. Trends in the incidence of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* infection in children's hospitals in the United States. Clin Infect Dis. 2009 Jul 1;49(1):65-71. doi: dx.doi.org/10.1086/599348.

Giri S, Kindo AJ. A review of *Candida* species causing blood stream infection. Indian J Med Microbiol. 2012 Jul-Sep;30(3):270-8. doi: dx.doi.org/10.4103/0255-0857.99484.

Gründemann C, Gruber CW, Hertrampf A, Zehlb M, Kopp B, Hubera R. An aqueous birch leaf extract of *Betula pendula* inhibits the growth and cell division of inflammatory lymphocytes. *J Ethnopharmacol.* 2011;136(3):444-51. doi: dx.doi.org/10.1016/j.jep.2011.05.018.

Guo L, McLean JS, Yang Y, Eckert R, Kaplan CW, Kyme P, et al. Precision-guided antimicrobial peptide as a targeted modulator of human microbial ecology. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2015 Jun 16;112(24):7569-74. doi: dx.doi.org/10.1073/pnas.1506207112.

Gwon WG, Lee MS, Kim JS, Kim JI, Lim CW, Kim NG, et al. Hexane fraction from *Sargassum fulvellum* inhibits lipopolysaccharide-induced inducible nitric oxide synthase expression in RAW 264.7 cells via NF- κ B pathways. *Am J Chin Med.* 2013;41(3):565-84. doi: dx.doi.org/10.1142/S0192415X13500407.

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

Havlik J, de la Huebra RG, Hejtmankova K, Fernandez J, Simonova J, Melich M, et al. Xanthine oxidase inhibitory properties of Czech medicinal plants. *J Ethnopharmacol.* 2010 Nov 11;132(2):461–5. doi: dx.doi.org/10.1016/j.jep.2010.08.044.

Höfling JF, Anibal PC, Obando-Pereda GA, Peixoto IA, Furletti VF, Foglio MA, et al. Antimicrobial potential of some plant extracts against *Candida* species. *Braz J Biol.* 2010 Nov;70(4):1065–8.

Huang XJ, Ren W, Li J, Chen LY, Mei ZN. Anti-inflammatory and anticancer activities of ethanol extract of *Pendulous monkshood* root *in vitro*. *Asian Pac J Cancer Prev.* 2013;14(6):3569-73.

Huong DT, Zhaob Y, Nguyet NT, Loan TT, Binh NTT, Thinh NV. *Candida krusei* colonization in patients with gastrointestinal diseases. *Med Mycol.* 2013; 51(8):884-7. doi: dx.doi.org/10.3109/13693786.2013.804215.

Hu Y, Guerrero E, Keniry M, Manrique J, Bullard JM. Identification of chemical compounds that inhibit the function of glutamyl-tRNA synthetase from *Pseudomonas aeruginosa*. *J Biomol Screen.* 2015 Oct;20(9):1160-70. doi: dx.doi.org/10.1177/1087057115591120.

Jeong EJ, Kim NH, Heo JD, Lee KY, Rho JR, Kim Y, et al. Antifibrotic compounds from *Liriodendron tulipifera* attenuating HSC-T6 proliferation and TNF- α production in RAW264.7 Cells. *Biol Pharm Bull*. 2015;38(2):228–34. doi: : dx.doi.org/10.1248/bpb.b14-00583.

Jesus D, Oliveira JR, Oliveira FE, Higa KC, Junqueira JC, Jorge AOC, et al. *Persea americana* glycolic extract : in vitro study of antimicrobial activity against *Candida albicans* biofilm and cytotoxicity evaluation. *Scientific World Journal*. 2015:531972. doi: dx.doi.org/10.1155/2015/531972.

Jones NP, Arnason JT, Abou-Zaid M, Akpagana K, Sanchez-Vindas P, Smith ML. Antifungal activity of extracts from medicinal plants used by First Nations People of eastern Canada. *J Ethnopharmacol*. 2000 Nov;73(1-2):191–8.

Kaur R, Domergue R, Zupancic ML, Cormack B. A yeast by any other name: *Candida glabrata* and its interaction with the host. *Current Opinion Microbiol*. 2005 Aug;8(4):378-84.

Klevens RM, Morrison MA, Nadle J, Petit S, Gershman K, Ray S, et al. Invasive methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* infections in the United States. *JAMA*. 2007 Oct 17;298(15):1763-71.

Krzyściak W, Jurczak A, Kościelniak D, Bystrowska B, Skalniak A. The virulence of *Streptococcus mutans* and the ability to form biofilms. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*. 2014 Apr;33(4):499–515. doi: dx.doi.org/10.1007/s10096-013-1993-7.

Lautenbach E, Metlay JP, Mao X, Han X, Fishman NO, Bilker WB, et al. The prevalence of fluoroquinolone resistance mechanisms in colonizing *Escherichia coli* isolates recovered from hospitalized patients. *Clin Infect Dis*. 2010 Aug 1;51(3):280–5. doi: dx.doi.org/10.1086/653931.

Lee SH. Antimicrobial effects of herbal extracts on *Streptococcus mutans* and normal oral streptococci. *J Microbiol*. 2013 Aug;51(4):484-9. doi: dx.doi.org/10.1007/s12275-013-3312-5.

Ligacheva AA, Danilets MG, Tro ES, Belsky YP, Belska N V, Zyuz GN, et al. Signaling events during macrophage activation with *Betula pendula* Roth pectic polysaccharides. *Bull Exp Biol Med*. 2014 Feb;156(4):465–9. doi: dx.doi.org/10.1007/s10517-014-2375-6.

Liu XB, Yang BX, Zhang L, Lu YZ, Gong MH, Tian JK. An *in vivo* and *in vitro* assessment of the anti-inflammatory, antinociceptive, and immunomodulatory activities of *Clematis terniflora* DC. extract, participation of aurantiamide acetate. *J Ethnopharmacol.* 2015 Jul 1;169:287–94. doi: dx.doi.org/10.1016/j.jep.2015.04.009.

Livermore DM. Current epidemiology and growing resistance of Gram negative pathogens. *Korean J Intern Med.* 2012 Jun;27(2):128-42. doi: dx.doi.org/10.3904/kjim.2012.27.2.128.

Li XZ, Nikaido H. Efflux-mediated drug resistance in bacteria: an update. *Drugs.* 2009 Aug 20;69(12):1555-623. doi: dx.doi.org/10.2165/11317030-000000000-00000.

Mai-Prochnow A, Bradbury M, Ostrikov K, Murphy AB. *Pseudomonas aeruginosa* biofilm response and resistance to cold atmospheric pressure plasma is linked to the redox-active molecule phenazine. *PLoS One.* 2015 Jun 26;10(6):e0130373. doi: dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0130373.

Malolo FAE, Nougá AB, Kakam A, Franke K, Ngah L, Flausino Jr O, et al. Protease-inhibiting, molecular modeling and antimicrobial activities of extracts and constituents from *Helichrysum foetidum* and *Helichrysum mechowianum* (Compositae). *Chem Cent J.* 2015 May 30;9:32. doi: dx.doi.org/10.1186/s13065-015-0108-1.

Martinez LR, Fries BC. Fungal biofilms: relevance in the setting of human disease. *Curr Fungal Infect Rep.* 2010 Dec 1;4(4):266–75.

McClay K, Mehboob S, Yu J, Santarsiero BD, Deng J, Cook JL, et al. Indole trimers with antibacterial activity against Gram-positive organisms produced using combinatorial biocatalysis. *AMB Express.* 2015 Dec; 5(1):125. doi: dx.doi.org/10.1186/s13568-015-0125-4.

McMillan BD, Miller GJ, Nguyen J. Rare case of exogenous *Candida dubliniensis* endophthalmitis: a case report and brief review of the literature. *J Ophthalmic Inflamm Infect.* 2014 May;4:11. doi: dx.doi.org/10.1186/1869-5760-4-11.

Menković N, Savikin K, Tasić S, Zdunić G, Stesević D, Milosavljević S, et al. Ethnobotanical study on traditional uses of wild medicinal plants in Prokletije Mountains (Montenegro). *J Ethnopharmacol.* 2011 Jan 7;133(1):97–107. doi: dx.doi.org/10.1016/j.jep.2010.09.008.

Mesa-Arango AC, Forastiero A, Bernal-Martínez L, Cuenca-Estrella M, Mellado E, Zaragoza O. The non-mammalian host *Galleria mellonella* can be used to study the virulence of the fungal pathogen *Candida tropicalis* and the efficacy of antifungal drugs during infection by this pathogenic yeast. *Med Mycol.* 2013 Jul;51(5):461-72. doi: dx.doi.org/10.3109/13693786.2012.737031.

Mesaros N, Nordmann P, Plesiat P, Roussel-Delvallez M, Van Eldere J, Glupczynski Y, et al. *Pseudomonas aeruginosa*: resistance and therapeutic options at the turn of the new millenium. *Clin Microbiol Infect.* 2007 Jun;13(6):560–78.

Namita P, Mukesh R. Medicinal plants used as antimicrobial agents: a review. *Intern Res J Pharm.* 2012;3(1):31–40.

Oliveira SA, Zambrana JRM, Di Iorio FBR, Pereira CA, Jorge AO. The antimicrobial effects of *Citrus limonum* and *Citrus aurantium* essential oils on multi-species biofilms. *Braz Oral Res.* 2014;28:22-7.

Omar S, Lemonnier B, Jones N, Ficker C, Smith ML, Neema C, et al. Antimicrobial activity of extracts of eastern North American hardwood trees and relation to traditional medicine. *J Ethnopharmacol.* 2000 Nov;73(1-2):161–70.

Otto M. Basis of virulence in community-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Annu Rev Microbiol.* 2010;64:143–62. doi: dx.doi.org/10.1146/annurev.micro.112408.134309.

Oyungerel B, Lim H, Lee CH, Choi EH, Li GH, Choi KD. Anti-inflammatory effects of *Magnolia sieboldii* extract in lipopolysaccharide-stimulated RAW264.7 macrophages. *Trop J Pharm Res.* 2013;12(6):913-8.

Papon N, Savini V, Lanoue A, Simkin AJ, Creche J, Giglioli-Guivarc'h N, et al. *Candida guilliermondii*: biotechnological applications, perspectives for biological control, emerging clinical importance and recent advances in genetics. *Curr Genet.* 2013 Aug;59(3):73-90. doi: dx.doi.org/10.1007/s00294-013-0391-0.

Paul AT, Gohil VM, Bhutani KK. Modulating TNF- α signaling with natural products. *Drug Discov Today.* 2006 Aug;11(15-16):725–32.

Pennington TH. *E. coli* O157 outbreaks in the United Kingdom: past, present, and future. *Infect Drug Resist.* 2014 Aug 19;7:211–22. doi: 10.2147/IDR.S49081.

Pfaller MA, Diekema DJ, Mendez M, Kibbler C, Erzsebet P, Chang SC et al. *Candida guilliermondii*, an opportunistic fungal pathogen with decreased susceptibility to fluconazole: geographic and temporal trends from the Artemis disk antifungal surveillance program. *J Clin Microbiol*. 2006 Oct;44(10):3551–6.

Pieri FA, Mussi MC, Fiorini JE, Moreira MA, Schneedorf JM. Bacteriostatic effect of copaiba oil (*Copaifera officinalis*) against *Streptococcus mutans*. *Braz Dent J*. 2012;23(1):36-8.

Pires RH, Montanari LB, Martins CHG, Zaia JE, Almeida AMF, Matsumoto MT, et al. Anticandidal efficacy of cinnamon oil against planktonic and biofilm cultures of *Candida parapsilosis* and *Candida orthopsilosis*. *Mycopathologia*. 2011 Dec;172(6):453–64. doi: dx.doi.org/10.1007/s11046-011-9448-0.

Radosavljevic V, Finke, EJ, Belojevic G. *Escherichia coli* O104:H4 outbreak in Germany—clarification of the origin of the epidemic. *Eur J Public Health*. 2015 Feb;25(1):125–9. doi: dx.doi.org/10.1093/eurpub/cku048.

Ramage G, Rajendran R, Sherry L, Williams C. Fungal biofilm resistance. *Int J Microbiol*. 2012;2012;528521.

Rastogi S, Pandey MM, Kumar Singh Rawat A. Medicinal plants of the genus *Betula*-Traditional uses and a phytochemical-pharmacological review. *J Ethnopharmacol*. 2015 Jan 15;159:62–83. doi: dx.doi.org/10.1016/j.jep.2014.11.010.

Rodrigues CF, Silva S, Henriques M. *Candida glabrata*: a review of its features and resistance. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*. 2014 May;33(5):673–88. doi: dx.doi.org/10.1007/s10096-013-2009-3.

Samie A, Tambani T, Harshfield E, Green E, Ramalivhana JN, Bessong PO. Antifungal activities of selected Venda medicinal plants against *Candida albicans*, *Candida krusei* and *Cryptococcus neoformans* isolated from South African AIDS patients. *African J Biotechnol*. 2010;9(20):2965–76.

Samoilova Z, Muzyka N, Lepekhina E, Oktyabrsky O, Smirnova G. Medicinal plant extracts can variously modify biofilm formation in *Escherichia coli*. *Antonie Van Leeuwenhoek*. 2014 Apr;105(4):709–22. doi: dx.doi.org/10.1007/s10482-014-0126-3.

Sankari SL, Gayathri K, Balachander N, Malathi L. *Candida* in potentially malignant oral disorders. J Pharm Bioallied Sci. 2015 Apr;7(Suppl1):5162-4. doi: dx.doi.org/10.4103/0975-7406.

Sarić-Kundalić B, Dobes C, Klätte-Asselmeyer V, Saukel J. Ethnobotanical study on medicinal use of wild and cultivated plants in middle, south and west Bosnia and Herzegovina. J Ethnopharmacol. 2010 Aug;131(1):33–55. doi: dx.doi.org/10.1016/j.jep.2010.05.061.

Sato Y, Okamoto-shibayama K, Azuma T. Glucose-PTS Involvement in maltose metabolism by *Streptococcus mutans*. Bull Tokyo Dent Coll. 2015;56(2):93–103. dx.doi.org/10.2209/tdcpublication.56.93.

Schühly W, Heilmann J, Calis I, Sticher O. New triterpenoids with antibacterial activity from *Zizyphus joazeiro*. Planta Med. 1999 Dec;65(8):740-3.

Schuster MG, Meibohm A, Lloyd L, Strom B. Risk factors and outcomes of *Candida krusei* bloodstream infection: A matched, case-control study. J Infect. 2013 Mar;66(3):278-84. doi: dx.doi.org/10.1016/j.jinf.2012.11.002.

Shetty S, Thomas B, Shetty V, Bhandary R, Shetty RM. An *in vitro* evaluation of the efficacy of garlic extract as an antimicrobial agent on periodontal pathogens: A microbiological study. Ayu. 2013 Oct;34(4):445-51. doi: dx.doi.org/10.4103/0974-8520.127732.

Silva S, Negri M, Henriques M, Oliveira R, Williams DW, Azeredo J. *Candida glabrata*, *Candida parapsilosis* and *Candida tropicalis*: biology, epidemiology, pathogenicity and antifungal resistance. FEMS Microbiol Rev. 2012 Mar;36(2):288–305. doi: dx.doi.org/10.1111/j.1574-6976.2011.00278.x.

Snowden R, Harrington H, Morrill K, Jeane L, Garrity J, Orian M, et al. A Comparison of the anti-*Staphylococcus aureus* activity of extracts from commonly used medicinal plants. J Altern Complement Med. 2014 May;20(5):375:82. doi: dx.doi.org/10.1089/acm.2013.0036.

Sripanidkulchai B, Junlatat J. Bioactivities of alcohol based extracts of *Phyllanthus emblica* branches: antioxidation, antimelanogenesis and anti-inflammation. J Nat Med. 2014 Jul; 68(3):615-22. doi: dx.doi.org/10.1007/s11418-014-0824-1.

Strateva T, Yordanov D. *Pseudomonas aeruginosa* - a phenomenon of bacterial resistance. J Med Microbiol. 2009 Sep;58(Pt9):1133–48. doi: dx.doi.org/10.1099/jmm.0.009142-0.

Sullivan DJ, Moran GP, Coleman DC. *Candida dubliniensis*: ten years on. FEMS Microbiol Lett. 2005 Dec 1;253(1):9-17.

Sullivan DJ, Westermeng TJ, Haynes KA, Bennett DE, Coleman DC. *Candida dubliniensis* sp. nov.: phenotypic and molecular characterization of a novel species associated with oral candidosis in HIV-infected individuals. Microbiology. 1995 Jul;141(Pt7):1507–21.

Teodoro GR, Brighenti FL, Delbem ACB, Delbem ACB, Khouri S, Gontijo AVL, et al. Antifungal activity of extracts and isolated compounds from *Buchenavia tomentosa* on *Candida albicans* and non-*albicans*. Future Microbiol. 2015;10(6): 917-27. doi: dx.doi.org/10.2217/fmb.15.20.

Toyofuku M, Roschitzki B, Riedel K, Eberl L. Identification of Proteins Associated with the *Pseudomonas aeruginosa* Biofilm Extracellular Matrix. J Proteome Res. 2012 Oct;11(10):4906-15. doi: dx.doi.org/10.1021/pr300395j.

Tsai PW, Chen YT, Hsu PC, Lan CY. Study of *Candida albicans* and its interactions with the host: A mini review. Biomedicine. 2013 Mar;3(1):51-64.

Tunón H, Olavsdotter C, Bohlin L. Evaluation of anti-inflammatory activity of some Swedish medicinal plants. Inhibition of prostaglandin biosynthesis and PAF-induced exocytosis. J Ethnopharmacol. 1995 Out;48(2):61-76.

Uppuluri P, Nett J, Heitman J, Andes D. Synergistic effect of calcineurin inhibitors and fluconazole against *Candida albicans* biofilms. Antimicrob Agents Chemother. 2008 Mar;52(3):1127-32. doi: dx.doi.org/10.1128/AAC.01397-07.

Välilmaa AL, Honkalampi-Hämäläinen U, Pietarinen S, Willför S, Holmbom B, von Wright A. Antimicrobial and cytotoxic knotwood extracts and related pure compounds and their effects on food-associated microorganisms. Int J Food Microbiol. 2007 Apr 10;115(2):235–43.

Venkatesan N, Perumal G, Doble M. Bacterial resistance in biofilm-associated bacteria. Future Microbiol. 2015 Nov;10:1743-50. doi: dx.doi.org/10.2217/fmb.15.69.

Wacker K, Gründemann C, Kern Y, Bredow L, Huber R, Reinhard T, et al. Inhibition of corneal inflammation following keratoplasty by birch leaf extract. Exp Eye Res. 2012 Apr;97(1):24-30. doi: dx.doi.org/10.1016/j.exer.2012.01.004.

Webster D, Taschereau P, Belland RJ, Sand C, Rennie RP. Antifungal activity of medicinal plant extracts; preliminary screening studies. *J Ethnopharmacol.* 2008 Jan 4;115(1):140–6.

Wojnicz D, Kucharska AZ, Sokol-Letowska A, Kicia M, Tichaczek-Goska D. Medicinal plants extracts affect virulence factors expression and biofilm formation by the uropathogenic *Escherichia coli*. *Urol Res.* 2012 Dec;40(6):683–97. doi: dx.doi.org/10.1007/s00240-012-0499-6.

Yang S, Liang N, Li H, Xue W, Hu D, Jin L, et al. Design, synthesis and biological evaluation of novel betulinic acid derivatives. *Chem Cent J.* 2012 Nov 23;6(1):141. doi: dx.doi.org/10.1186/1752-153X-6-141.

Yi JE, Obminska-Mrukowicz B, Yuan LY, Yuan H. Immunomodulatory effects of betulinic acid from the bark of white birch on mice. *J Vet Sci.* 2010 Dec;11(4):305-13.

Yoon JY, Jeong HY, Kim SH, Kim HG, Nam G, Kim JP et al. Methanol extract of *Evodia leptota* displays Syk/Src-targeted anti-inflammatory activity. *J Ethnopharmacol.* 2013 Jul 30;148(3):999-1007. doi: dx.doi.org/10.1016/j.jep.2013.05.030.

Zarrin M, Mahmoudabadi AZ. Invasive candidiasis; a review article. *Jundishapur J Microbiol.* 2009;2(1):1-6.

ANEXO A – Laudo do extrato glicólico de *Betula pendula*



EXTRATO GLICÓLICO DE BÉTULA (HG)

Nome Científico: *Betula alba L. syn. B. Pendula Roth* / Betulaceae

INCI: Betula Alba Leaf Extract

Nº CAS: 84012-15-7

Parte Utilizada: Folhas

Fórmula Molecular: N.A

Peso Molecular: N.A

PRINCÍPIOS ATIVOS

Óleo essencial; tanino; derivado triterpênico (betulina); saponinas; flavonóides; resinas (constituída de éster butílico e do ácido betuloretico).

PROPRIEDADES E EMPREGOS TERAPÊUTICOS

O Extrato Glicólico de Bétula tem ação adstringente; tônico, estimulante, antiqueda e anticasca, tônico capilar. Ajuda a eliminar a caspa e a seborréia.

Poderá ser incorporado em cremes, loções cremosas, hidroalcoólicas ou tônicas, géis, sabonetes, loção de limpeza, máscaras faciais, preparações capilares, creme para massagem, produtos para pele oleosa e cosméticos em geral.

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

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

ESTOCAGEM E VALIDADE

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

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

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

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- 1- Cravo, A.B. 'Frutas e Ervas que Curam – Panacéia Vegetal'. 3ª ed. Ed. Helmus.
- 2- Cruz, G.L., Dicionário das Plantas Úteis do Brasil. Ed. Civilização Brasileira, 1985.
- 3- Moreira, F.; As Plantas que Curam. Ed. Helmus, 1985.