



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

JONATAS RAFAEL DE OLIVEIRA

**AVALIAÇÃO DE ATIVIDADES BIOLÓGICAS
DOS EXTRATOS DE *Rosmarinus officinalis* L. (ALECRIM) E
Thymus vulgaris L. (TOMILHO)**

2016

JONATAS RAFAEL DE OLIVEIRA

**AVALIAÇÃO DE ATIVIDADES BIOLÓGICAS
DOS EXTRATOS DE *Rosmarinus officinalis* L. (ALECRIM) E
Thymus vulgaris L. (TOMILHO)**

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

Orientador: Profa. Adj. 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.

Oliveira, Jonatas Rafael de

Avaliação de atividades biológicas dos extratos de *Rosmarinus officinalis* L. (alecrim) e *Thymus vulgaris* L. (tomilho) / Jonatas Rafael de Oliveira. - São José dos Campos : [s.n.], 2016.
156 f. : il.

Tese (Doutorado em Biopatologia Bucal) - Pós-graduação em Biopatologia Bucal - Instituto de Ciência e Tecnologia de São José dos Campos, UNESP - Univ Estadual Paulista, 2016.
Orientadora: Luciane Dias de Oliveira.

1. *Rosmarinus officinalis*. 2. *Thymus vulgaris*. 3. Biofilmes. 4. Citotoxicidade. 5. Atividade anti-inflamatória. I. Oliveira, Luciane Dias de, 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, 12 de fevereiro de 2016
E-mail: jroliveira16@hotmail.com

Assinatura: _____

BANCA EXAMINADORA

Profa. Adj. Luciane Dias de Oliveira (Orientadora)

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

Profa. Dra. Marcela Pellegrini Peçanha

Faculdade de Ciências Médicas e da Saúde
PUC/SP – Pontifícia Universidade Católica de São Paulo
Campus de São Paulo

Profa. Dra. Cristina Pacheco Soares

Instituto de Pesquisa e Desenvolvimento
UNIVAP – Universidade do Vale do Paraíba
Campus de São José dos Campos

Prof. Tit. Antonio Olavo Cardoso Jorge

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

Profa. Dra. Samira Esteves Afonso Camargo

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

São José dos Campos, 12 de fevereiro de 2016.

DEDICATÓRIA

Dedico esta obra a Deus que me proporcionou a realização deste sonho.

Ao meu Senhor, que durante todo este tempo esteve me amparando, me inspirando, me ensinando, guardando meus passos, abençoando minha mente, minhas mãos, minha saúde. Sem Ele seria impossível ter chegado até aqui.

Por tudo, obrigado Senhor.

AGRADECIMENTOS ESPECIAIS

Aos meus pais.

São vocês que me amparam quando minhas forças se exaurem, quando minha fé se abala, quando meu fôlego passa a ser mais lento.

É no seu colo, minha mãe, que encontro o aconchego perfeito, o consolo necessário para minhas queixas. Obrigado por me ouvir, por me aconselhar, por acreditar em mim. Obrigado pelo seu amor energizante, incondicional, reconfortante, terno e verdadeiro.

É com seu exemplo, meu pai, que busco trilhar meu caminho. Seu pensamento positivo me instiga a tentar sempre. Suas palavras de sabedoria são para mim como uma bússola. Obrigado por me ensinar o caminho que eu devo andar.

À senhora minha mãe e ao senhor meu pai meus sinceros agradecimentos. A vocês dedico todo meu amor.

A minha família.

Irmãs, sobrinhos, cunhados, meu muito obrigado a vocês, pelo apoio, pelas palavras de carinho e de admiração, pela compreensão e por toda positividade que me oferecem constantemente.

À Profa. Adj. Luciane Dias de Oliveira.

Impossível lembrar de você como sendo apenas minha orientadora, minha professora. Em você posso ver sim uma competente orientadora e professora, porém, vejo também uma conselheira, uma ajudadora, uma amiga. Lembro-me do primeiro dia que trocamos as primeiras palavras, da cordialidade que me tratou, da forma suave que conduzia as conversas, da paciência com um recém-chegado ao mundo acadêmico, isso lá no mestrado ainda. Tudo isso contribuiu para que eu chegasse até aqui. Com o passar do tempo, foi me ensinando, mostrando como deveria agir, foi me dando oportunidades para meu crescimento como profissional, abrindo portas como ninguém tinha feito antes. Toda palavra de agradecimento que eu venha expressar ainda seria pouco para lhe agradecer por tudo o que fez para mim e por mim, pela sua confiança, pela sua amizade, por todos os ensinamentos, por toda colaboração dada para eu ter chegado até aqui. Tenho você como espelho, como exemplo de pesquisadora, de professora, de ser humano. Lu, muito obrigado por tudo. Que Deus lhe abençoe grandemente todos os dias de sua vida.

AGRADECIMENTOS

À Universidade Estadual Paulista – UNESP. Na pessoa do diretor do Instituto de Ciência e Tecnologia de São José dos Campos, **Prof. Tit. Estevão Tomomitsu Kimpara**, e da vice-diretora **Profa. Adj. Rebeca Di Nicoló**.

Ao Programa de Pós-graduação em Biopatologia Bucal. Na pessoa da coordenadora **Prof. Adj. Juliana Campos Junqueira** e vice-coordenadora **Profa. Dra. Ana Lia Anbinder**.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – CAPES. Pela bolsa de estudo que me proporcionou ter dedicação exclusiva à vida acadêmica que tanto amo e desejo prosseguir.

Aos docentes. Cada um com sua peculiaridade me mostrou como é ser professor, como é ser pesquisador. Com isso, se tornaram exemplos para mim, exemplos de profissionais, de seres humanos cheios de virtudes, de boas condutas, respeitadores da ética e moral. Muito obrigado por terem me dado o prazer de tê-los como participantes da minha formação.

- **Departamento de Biociências e Diagnóstico Bucal (ICT/UNESP)**

Profa. Dra. Ana Lia Anbinder

Prof. Tit. Antonio Olavo Cardoso Jorge

Profa. Adj. Cristiane Yumi Koga Ito

Profa. Dra. Graziella Nuernberg Back Brito

Profa. Adj. Janete Dias Almeida

Prof. Adj. José Benedito Oliveira Amorim

Profa. Adj. Juliana Campos Junqueira
Profa. Dra. Luana Marotta Reis de Vasconcellos
Profa. Adj. Luciane Dias de Oliveira
Profa. Adj. Monica Fernandes Gomes
Profa. Dra. Renata Falchete do Prado
Profa. Adj. Rosilene Fernandes da Rocha
Profa. Dra. Samira Esteves Afonso Camargo
Profa. Tit. Yasmin Rodarte Carvalho

- Departamento de Odontologia Restauradora (ICT/UNESP)

Prof. Adj. Claudio Antonio Talge Carvalho

- Universidade do Vale do Paraíba (UNIVAP)

Profa. Dra. Cristina Pacheco Soares

- Universidade de Taubaté (UNITAU)

Profa. Dra. Mariella Vieira Pereira Leão

Profa. Dra. Silvana Soléo Ferreira dos Santos

Aos funcionários. Estendo meus agradecimentos a todos os funcionários que de certa forma contribuíram direta ou indiretamente para realização deste trabalho. Em especial aos funcionários:

Aluizio Sergio da Silva (Portaria)

Ana Paula S. C. Matos (Limpeza)

Bruno Shiguemitsu M. Tanaka (Secretaria de Pós-graduação)

Carlos Alberto Guedes (STAEPE)

Domingos G. Pontes (Laboratório de Microbiologia e Imunologia)

Edson Silva (Portaria)

Gilson Santos (Portaria)

Ivan Oliveira Damasceno (Secretaria de Pós-graduação)

Rosemary de Fátima Salgado (Secretaria de Pós-graduação)

Sérgio Giovanni Alves (Laboratório de Microbiologia e Imunologia)

Vanessa R. dos Santos (Secretaria - Biociências e Diagnóstico Bucal)

Walter Cruz (CEBAPE)

À Ana Paula Réquia Martins. Muito obrigado por sua dedicação e interesse na realização deste projeto, foi uma competente aluna de Iniciação Científica. Foi fundamental sua participação na execução e na divulgação dos resultados deste estudo em congressos científicos. Ana, lhe desejo um futuro de muito sucesso e de muitas realizações.

Aos amigos da UNESP: Laboratório de Microbiologia e Imunologia, Laboratório de Estudo Interdisciplinar em Células, Departamento de Odontologia Restauradora. São pessoas que passam não somente por nós, entre uma bancada e outra, entre um laboratório e outro, mas também pela nossa vida. Algumas são capazes de deixar inesquecíveis recordações de bons momentos de convivência, essas, tendemos levar conosco para sempre. Muito obrigado por terem sido meus professores, com suas histórias de vida, de superação, de conquista. Pude aprender um pouco com cada um de vocês. Desejo a todos uma vida próspera, com saúde e felicidade. Que nós nos reencontremos algum dia. Amigos, SUCESSO!

Adeline Lacerda Jorjão

Aline Chiodi

Ana Carolina Chipoletti

Ana Cláudia Xavier

Ana Luiza Rosário

Anna Carolina Costa

Camila Lopes

Camila Magnoni

Cristiane Pereira

Daiane de Jesus

Daphne Reis Mello

Elis Lima Zutin

Fábia Sper

Felipe de Camargo Ribeiro

Felipe Eduardo de Oliveira

Fernanda Freire

Fernanda Tomé

Flávia Cardoso

Gabriela Lima

Gabriela Santana

Gleyce Oliveira Silva

Guilherme Teodoro

Isabel Carvalho

Isabela Amêndola

Ivany Machado

Janaína Alvarenga

Jéssica Diane dos Santos

Júnia Oliveira Barbosa

Karen Cristiane Higa

Kely Karina Belato

Lais Morandini Carvalho

Lara Tolentino

Leandro Wagner Figueira

Leileane Cohn

Lígia Nishima Theodoro

Lírian Figueiredo

Lívia Mara

Lívia Procópio

Lucas de Paula

Maíra Terra Garcia

Maria Angela Lacerda Esper

Maria Aparecida Marras

Maria Fernanda Villaça

Marisol Velloso

Marta Falcão

Michelle Cardoso

Michelle Peneluppi

Mirian Marcolan de Mello

Mônica Oliveira Alves

Nádia Domingues

Naiara Pires Ramanzini

Pâmela Diniz

Patrícia Pimentel de Barros

Polyana das Graças F. Vilela

Rafaella Braga

Renata Marinho

Renata Moraes

Renata Pilli Joias

Rodnei D. Rossoni

Rosana Ferreira Silva

Rosemary Soares

Rosilene Aguiar Almeida

Suelen Simões

Simone Vilela

Vinícius Carlos de Castro

Yonara Marques

**Não to mandei eu? Esforça-te, e tem bom ânimo;
não temas, nem te espantes; porque o Senhor teu Deus é contigo, por
onde quer que andares.**

Josué 1:9

SUMÁRIO

RESUMO	13
ABSTRACT	15
1 INTRODUÇÃO	17
2 REVISÃO DA LITERATURA	20
2.1 Associações de micro-organismos em biofilmes	20
2.1.1 Definição de biofilme	20
2.1.2 Associação de <i>Candida albicans</i> e <i>Staphylococcus aureus</i>	21
2.1.3 Associação de <i>C. albicans</i> e <i>Enterococcus faecalis</i>	22
2.1.4 Associação de <i>C. albicans</i> e <i>Streptococcus mutans</i>	24
2.1.5 Associação entre <i>C. albicans</i> e <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	25
2.2 <i>Rosmarinus officinalis</i> L. (alecrim)	26
2.2.1 Atividade antimicrobiana	27
2.2.2 Citotoxicidade para células tumorais humanas	30
2.2.3 Atividade anti-inflamatória	31
2.2.4 Atividade antimutagênica	34
2.3 <i>Thymus vulgaris</i> L. (tomilho)	36
2.3.1 Atividade antimicrobiana	36
2.3.2 Citotoxicidade para células tumorais humanas	38
2.3.3 Atividade anti-inflamatória	39
2.2.4 Atividade antimutagênica	40
3 DETALHAMENTO METODOLÓGICO	42
3.1 Extratos vegetais	42
3.2 Atividade antimicrobiana	42
3.2.1 Micro-organismos	42
3.2.2 Ação sobre culturas planctônicas	43
3.2.3 Ação sobre biofilmes microbianos	44

3.2.3.1 Grupos experimentais	44
3.2.3.2 Formação dos biofilmes e tratamento com os extratos.....	45
3.3 Viabilidade celular	47
3.3.1 Linhagens celulares	47
3.3.2 Cultivo das células	47
3.3.3 Exposição às concentrações dos extratos	48
3.3.4 Teste de MTT	48
3.3.5 Teste de vermelho neutro (VN)	49
3.3.6 Teste de cristal violeta (CV)	49
3.4 Atividade anti-inflamatória	50
3.4.1 Formação dos grupos experimentais	50
3.4.2 Ensaio imunoenzimático ELISA	50
3.5 Genotoxicidade	52
3.6 Análise estatística	52
4 ARTIGOS	53
4.1 Artigo – Antimicrobial effect on mono- and polymicrobial biofilms, cell viability, anti-inflammatory activity and genotoxic profile of <i>Rosmarinus officinalis</i> L. extract – <i>in vitro</i> analysis	53
4.2 Artigo – <i>Thymus vulgaris</i> L. extract promotes action on mono- and polymicrobial biofilms of dental interest microorganisms, anti-inflammatory effect and absence of cytotoxicity and genotoxicity	100
5 ANÁLISE DOS ARTIGOS	143
6 REFERÊNCIAS	145

Oliveira JR. Avaliação de atividades biológicas dos extratos de *Rosmarinus officinalis* L. (alecrim) e *Thymus vulgaris* L. (tomilho) [tese]. São José dos Campos (SP): Instituto de Ciência e Tecnologia, UNESP - Univ Estadual Paulista; 2016.

RESUMO

No presente estudo foram avaliadas algumas atividades biológicas dos extratos de *R. officinalis* L. (alecrim) e *T. vulgaris* L. (tomilho), verificando: I. Atividade antimicrobiana sobre biofilmes monomicrobianos de *Candida albicans*, *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus faecalis*, *Streptococcus mutans* e *Pseudomonas aeruginosa* e associações de *C. albicans* com cada uma destas bactérias, após determinação da concentração inibitória mínima (CIM) e concentração microbicida mínima (CMM) sobre culturas planctônicas destes micro-organismos; II. Viabilidade celular sobre macrófagos de camundongo (RAW 264.7), fibroblastos gengivais humanos (FMM-1), linhagem tumoral de carcinoma mamário (MCF-7) e linhagem tumoral de carcinoma cervical (HeLa); III. Atividade anti-inflamatória sobre RAW 264.7 estimulada por lipopolissacarídeo (LPS) de *Escherichia coli*; e IV. Atividade genotóxica. Após verificação da capacidade antimicrobiana dos extratos, por método de microdiluição em caldo, as concentrações mais efetivas foram aplicadas nos demais testes. Sobre os biofilmes mono e polimicrobianos, formados por 48 h em poços de placa de microtitulação, a ação dos extratos foi analisada após exposição de 5 min, com quantificação de UFC/mL e análise de sua viabilidade. Da mesma forma, sobre as linhagens celulares (RAW 264.7, FMM-1, MCF-7 e HeLa), cultivadas por 24 h em placas de microtitulação, os extratos foram analisados com os ensaios de MTT, vermelho neutro (VN) e cristal violeta (CV). Foi analisado o efeito anti-inflamatório dos extratos com ensaio imunoenzimático ELISA, pela quantificação de citocinas pró-inflamatórias (TNF- α e IL-1 β). A genotoxicidade dos extratos foi verificada pela frequência de micronúcleos (MN) formados em 1000 células. Os resultados foram analisados por T-Test ou ANOVA e Tukey Test ($p \leq 0,05$). Em relação ao extrato de *R. officinalis* L. foi observada redução significativa de todos os biofilmes após exposição de 5 min, bem como, redução de sua viabilidade. Quanto às células, foi observado viabilidade celular acima de 50% a ≤ 50 mg/mL. O nível de IL-1 β não se alterou com as concentrações do extrato, entretanto quando RAW 264.7 foi estimulada por LPS, houve inibição da produção desta citocina. Em relação ao nível de TNF- α , houve modulação da síntese desta citocina, sem e com LPS. Foi constatado também ausência de genotoxicidade,

uma vez que, a frequência de MN foi semelhante ou menor ao grupo controle. Em relação ao extrato de *T. vulgaris* L., todos os biofilmes mono e polimicrobianos apresentaram reduções significativas em comparação ao grupo controle. A viabilidade dos biofilmes também foi reduzida. Sobre todas as linhagens celulares foi observada viabilidade celular acima de 50%. Efeito imunomodulador foi observado na síntese de IL-1 β e TNF- α . A formação de MN foi semelhante ou inferior ao grupo controle, em todas as linhagens. Com isso, foi concluído que ambos os extratos foram efetivos sobre biofilmes mono e polimicrobianos, proporcionaram viabilidade celular para as culturas acima de 50%, apresentaram efeito imunomodulador e não foram genotóxicos.

Palavras-chave: *Rosmarinus officinalis*. *Thymus vulgaris*. Atividade antimicrobiana. Biofilmes. Citotoxicidade. Atividade anti-inflamatória. Genotoxicidade.

Oliveira JR. Assessment of biological activities of *Rosmarinus officinalis* L. (rosemary) and *Thymus vulgaris* L. (thyme) extracts. [doctorate thesis]. São José dos Campos (SP): Institute of Science and Technology, UNESP - Univ Estadual Paulista; 2016.

ABSTRACT

This study performed some biological activities of *R. officinalis* L. (rosemary) and *T. vulgaris* L. (thyme) extracts, such as: I. Antimicrobial activity on monomicrobial biofilms of *Candida albicans*, *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus faecalis*, *Streptococcus mutans* and *Pseudomonas aeruginosa* and *C. albicans* association with each of these bacteria, after determination of the minimum inhibitory concentration (MIC) and minimum microbicidal concentration (MMC) on planktonic cultures of these microorganisms; II. Cell viability on mouse macrophages (RAW 264.7), human gingival fibroblasts (FMM-1), human breast carcinoma cells (MCF-7) and cervical carcinoma cells (HeLa); III. Anti-inflammatory activity on lipopolysaccharide (LPS)-stimulated RAW 264.7; and IV. Genotoxic activity. After checking the antimicrobial capacity of the extracts by broth microdilution method, the most effective concentrations were applied in the other tests. On mono- and polymicrobial biofilms formed by 48 h in microtitre plate wells, the action of the extracts was analyzed after 5 min exposure, with counting of CFU/mL and analysis of their viability. Likewise, in the cell lines (RAW 264.7, FMM-1, MCF-7 and HeLa cells) cultured for 24 h in microtitre plates, the extracts were analyzed by MTT, neutral red (NR) and crystal violet (CV) assays. By ELISA assay, anti-inflammatory effect of the extracts was analyzed with quantification of proinflammatory cytokines (TNF- α and IL-1 β). The genotoxicity of the extracts was verified by the micronuclei frequency (MN) formed in 1000 cells. The results were analyzed by T-Test or ANOVA and Tukey test ($p \leq 0.05$). Regarding the *R. officinalis* L. extract was observed significant reduction of all biofilms after 5 min of exposure, as well as reduction their viability. Additionally, cell viability above 50% to ≤ 50 mg/mL was observed on lineages. The IL-1 β level did not change with the concentrations of the extract, but when RAW 264.7 was stimulated by LPS, there was inhibition of the production of this cytokine. In relation to the level of TNF- α , was modulation of the synthesis of this cytokine with and without LPS. It was also observed lack of genotoxicity, since the frequency of MN was similar or less than the control group. Regarding to *T. vulgaris* L. extract, all mono and polymicrobial showed significant reductions compared to the control group. Their

viability was also reduced. On all cell lines was observed cell viability above 50%. Immunomodulatory effect was observed in IL-1 β and TNF- α synthesis. The MN formation was similar or lower than the control group in all cell lines. Thus, it was concluded that both extracts were effective on mono- and polymicrobial biofilms, promoted cell viability above 50% for cultures, presented immunomodulatory effect and were non-genotoxic.

Keywords: *Rosmarinus officinalis*. *Thymus vulgaris*. Antimicrobial activity. Biofilms. Cytotoxicity. Anti-inflammatory activity. Genotoxicity.

1 INTRODUÇÃO

Desde tempos remotos os seres humanos buscam na natureza elementos para sua sobrevivência, com destaque para alimentação e saúde. Especificamente neste último item, a natureza tem sido fonte para o tratamento de inúmeras enfermidades, bem como, para a prevenção de algumas delas. Para tanto, são utilizados microorganismos, vegetais ou animais, com bases nos efeitos benéficos de suas moléculas, proteínas ou outras substâncias com alguma característica farmacológica.

É possível encontrar na literatura estudos focados na avaliação de atividades biológicas de diferentes espécies vegetais, que podem incluir atividade antimicrobiana (de Oliveira et al., 2013, 2014) antiviral (Sanna et al., 2015), antihelmíntica (Metuge et al., 2014), antiprotozoário (Falodun et al., 2014), anti-inflamatória (Jeong et al., 2015), antimutagênica (Ruiz-Montañez et al., 2015), anticarcinogênica (Munari et al., 2014), antiproliferativa (Formagio et al., 2015), antipirética (Kunnaja et al., 2014), analgésica (Souza et al., 2015), entre outras.

Dois espécies de plantas medicinais se destacam e são mundialmente conhecidas e popularmente utilizadas, tanto na medicina popular e na culinária tradicional, como na indústria, com reconhecidas atividades biológicas: *Rosmarinus officinalis* L., conhecida como alecrim, e *Thymus vulgaris* L., também chamada de tomilho. Relatos apontam a origem destas espécies vegetais como sendo mediterrânea, porém atualmente podem ser encontradas em muitas partes do planeta, sendo utilizadas na condimentação de alimentos, bem como, na medicina popular (Ismaili et al., 2004; Jamali et al., 2012; Rašković et al., 2014).

R. officinalis L. apresenta efeitos como antibacteriano (Fratini et al., 2014); antifúngico (Gauch et al., 2014), antiviral (Shin et al., 2013), antibiofilme (Smullen et al., 2012), antitumoral (González-Vallinas et al., 2014), anti-inflamatório (Yu et al., 2013), antileishmânico (Ahmed et al., 2011) e antioxidante (Ahmed et al., 2011). Desta mesma forma, *T. vulgaris* L. tem sido citado na literatura com resultados satisfatórios com atuação antibacteriana (Belaqziz et al., 2013), antifúngica (Khan et al., 2014), antiviral (Rezatofghi et al., 2014), antioxidante (Galasso et al., 2014), antitumoral (Ayesh et al., 2014) e anti-inflamatória (Galasso et al., 2014). A amplitude das avaliações biológicas destes vegetais permite a aplicação de diferentes métodos para a constatação de um efeito farmacológico. Com isso, torna-se interessante a avaliação antimicrobiana sobre biofilmes polimicrobianos envolvendo espécie fúngica e bacteriana, uma vez que, naturalmente os micro-organismos se encontram distribuídos nos diferentes nichos ecológicos em associações interespecíficas. Dentre os micro-organismos de interesse, podemos citar *Candida albicans*, *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus faecalis*, *Streptococcus mutans* e *Pseudomonas aeruginosa* que são de grande importância para Medicina e Odontologia (de Oliveira et al., 2014), de modo que a ação de extratos de plantas sobre tais biofilmes pode ser bem relevante na prevenção e controle de diferentes infecções.

Com relação à citotoxicidade, busca-se utilizar os fitoterápicos em doses que promovam inibição de proliferação neoplásica, porém que permita o desenvolvimento de células não tumorais. Em adição, a aplicação de diferentes doses para constatação de inibição de um processo inflamatório descontrolado, que pode causar sérios danos ao hospedeiro, poderá contribuir para o restabelecimento do equilíbrio de mediadores químicos. Outro aspecto farmacológico a ser analisado é o efeito antimutagênico que poderá contribuir para proteção de danos ao material genético eventualmente provocado por fatores intrínsecos ou extrínsecos às células.

Com a constatação dos benefícios destes produtos vegetais, relacionados com o controle de diversos fatores que possam contribuir para inúmeras manifestações patológicas em seres humanos, bem como o conhecimento de sua biocompatibilidade, poderá ser utilizado para o aprimoramento de produtos já utilizados para higiene pessoal e oral e talvez até para o aprimoramento de medicamentos, pensando na inserção destes produtos vegetais em diversas formulações já existentes e utilizadas pela população.

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 Associações de micro-organismos em biofilmes

2.1.1 Definição de biofilme

Biofilmes podem ser descritos como um microecossistema formado por micro-organismos de diferentes espécies que se encontram envolvidos por uma matriz extracelular composta por polissacarídeos e proteínas, produzidos por estes micro-organismos. Podendo ficar aderidos tanto a uma superfície abiótica, como materiais dentários, próteses, implantes, tubo endotraqueal, marcapasso e cateteres, como a uma superfície biótica, como tecidos do hospedeiro (Kojic, Darouiche, 2004; Harriott, Noverr, 2009; Ammons et al., 2014).

No microecossistema do biofilme são geradas inúmeras substâncias que podem afetar a superfície de aderência deste microecossistema. Um exemplo disso é a produção de ácidos gerados pela degradação de carboidratos provenientes da dieta do hospedeiro pelos micro-organismos, que estando sobre dentes, podem provocar desmineralização e possivelmente desenvolver lesões de cárie (Sun et al., 2014).

Os micro-organismos associados em biofilmes são mais resistentes aos agentes antimicrobianos, bem como à resposta imune do hospedeiro. Com isso, verifica-se a importância clínica do biofilme, uma vez que, podem servir como reservatório de infecções, pela imensa

variedade de espécies microbianas que o constitui (Harriott, Noverr, 2009).

Naturalmente os biofilmes são encontrados em associações interespecíficas em diferentes nichos bióticos ou abióticos. Nestas associações um micro-organismo pode favorecer ou prejudicar o desenvolvimento do outro, interferir na susceptibilidade aos antimicrobianos, bem como, interferir na expressão de genes que poderão levar ao aumento da virulência dos micro-organismos (Mastropaolo et al., 2005; O'Connell et al., 2006).

2.1.2 Associação de *Candida albicans* e *Staphylococcus aureus*

Biofilme monotípico de *C. albicans* pode ser formado inicialmente após o contato com uma superfície apropriada, cujo desenvolvimento dependerá de condições adequadas. Neste estágio inicial, as formas leveduriformes aderidas iniciam a formação de tubo germinativo e posteriormente, na fase intermediária, ocorrerá o alongamento destas hifas, bem como, a produção de matriz extracelular, sendo composta por carboidratos, principalmente glicose, e por proteínas. Em seguida, ocorrerá a formação de um biofilme maduro, composto por uma base de leveduras onde seguem aderidas as formas hifais, estando tudo envolvido pela matriz. Para sua recolonização, ocorrerá inicialmente o desprendimento de células-filhas a partir das hifas e estas células poderão se aderir em outros nichos e conseqüentemente poderão formar novo biofilme (Chandra et al., 2001; Al-Fattani, Douglas, 2004).

Geralmente, a formação de biofilme em superfícies abióticas, dependerá principalmente da presença de nutrientes, um fator que pode comprometer sua adesão (Cassat et al., 2014).

S. aureus é clinicamente relevante por apresentar elevados índices de infecções sistêmicas e mortalidade relacionadas principalmente com acúmulo de seu biofilme em dispositivos médicos (Katneni, Hedayati, 2007).

Tanto *C. albicans* como *S. aureus* podem ser responsáveis por inúmeros quadros infecciosos isoladamente, no entanto, em infecções polimicrobianas estes micro-organismos podem atuar conjuntamente (Baena-Monroy et al., 2005). Foi verificado que *S. aureus* pode facilmente aderir-se às hifas de *C. albicans*, formando assim um biofilme heterogêneo. Neste biofilme polimicrobiano, pode ser verificado a formação de uma base composta principalmente por hifas de *C. albicans*, onde seguem aderidos *S. aureus*. Adicionalmente, pode ser observada a formação de microcolônias de *S. aureus* na superfície deste biofilme (Harriott, Noverr, 2009).

Foi estimado que cerca de 27% de candidemias, em infecções nosocomiais, ocorreram em associação com outros micro-organismos, sendo *S. aureus* o terceiro mais comum (Klotz et al., 2007). Segundo Harriott e Noverr (2009), *C. albicans* pode contribuir para a formação do biofilme de *S. aureus* e, com isso, pode aumentar a resistência desta bactéria à ação de antimicrobianos.

2.1.3 Associação de *C. albicans* e *Enterococcus faecalis*

Estes dois micro-organismos são comensais do trato gastrointestinal, da cavidade oral e outros sítios não estéreis de mamíferos, incluindo os seres humanos, além de poderem estar associados a uma mesma comunidade polimicrobiana em um hospedeiro. Ambos compreendem uma porção relativamente pequena da microbiota corporal, contudo esta quantidade pode elevar-se significativamente ao

ponto de causar sérias complicações ao hospedeiro. Estes micro-organismos são patógenos oportunistas, com isso, podem causar importantes infecções sistêmicas devido a uma debilidade imunológica e conseqüentemente gerar altos níveis de morbidade e mortalidade. Em casos de infecção hospitalar, espécies de *Enterococcus* estão em terceiro lugar como agentes infecciosos mais comuns, sendo seguidas por espécies de *Candida*. Dentro do gênero *Enterococcus*, as espécies *E. faecalis* e *Enterococcus faecium* são as mais significativas e para o gênero *Candida*, a espécie *C. albicans* é a mais frequentemente isolada (Cruz et al., 2013).

É comum o co-isolamento tanto de *C. albicans* como de *Enterococcus* spp de um mesmo local de infecção, como foi observado no estudo de Mason et al. (2012), onde foi constatado um aumento significativo de enterococos na microbiota intestinal de camundongos não tratados com antibióticos, onde foram preliminarmente introduzidos apenas *C. albicans*.

No estudo realizado por Cruz et al. (2013), onde foi utilizado o nematódeo *Caenorhabditis elegans* como hospedeiro para infecção polimicrobiana de *C. albicans* e *E. faecalis*, foi observado que a morte do nematódeo não ocorreu por conta da associação destes micro-organismos. Em adição, foi constatado que houve inibição da formação de hifas por *C. albicans* pela ação de *E. faecalis*, ou seja, a bactéria atuou diretamente em um dos principais fatores de virulência de *C. albicans*, que é responsável por causar a morte deste nematódeo. Segundo os autores, a presença de *C. albicans* protegeu *E. faecalis* de morte celular. Com isso, a interação destes micro-organismos em *C. elegans* não foi danosa para o hospedeiro, sendo assim, ambos foram comensais e não patogênicos para o nematódeo, porém separadamente os micro-organismos apresentaram efeito foi oposto, altamente patogênico.

2.1.4 Associação de *C. albicans* e *Streptococcus mutans*

Sabe-se que *C. albicans* é o organismo fúngico mais comumente detectado nas superfícies mucosas dos seres humanos, com isso, geralmente está associada com uma extensa variedade de micro-organismos patogênicos (Morales, Hogan, 2010a; Peleg et al., 2010). Na cavidade oral, pode formar uma complexa comunidade microbiana juntamente com *Streptococcus* spp, principalmente as espécie *Streptococcus gordonii*, *Streptococcus sanguinis* e *S. mutans* (ten Cate et al., 2009; Gregoire et al., 2011).

C. albicans além de estar relacionada com complicações em tecidos moles, na cavidade oral, pode também influenciar na patogênese de cárie dental particularmente em pacientes pediátricos (de Carvalho et al., 2006; Raja et al., 2010). Nestes pacientes, pode ser formado um biofilme virulento à superfície dental, especialmente constituído por estreptococos do grupo mutans, em particular *S. mutans*, favorecido por precária higienização e elevado consumo de dieta rica em sacarose, fatores estes que promovem o aumento da prevalência de infecções de cárie neste público (Vadiakas, 2008; Parisotto et al., 2010). Em adição, a presença de micro-organismos acidogênicos e acidúricos pode proporcionar a progressão desta infecção (Kanasi et al., 2010).

S. mutans tem a habilidade de desenvolver-se em biofilme, uma vez que, esta espécie utiliza de forma eficaz a sacarose da dieta de seu hospedeiro para sintetizar polissacarídeo extracelular que dará sustentação a esta comunidade microbiana, para isso, este micro-organismo produz e faz uso excepcional de enzimas adsorvidas às superfícies de onde se encontram, como glicosiltransferases ou frutossiltransferases, favorecendo forte adesão deste biofilme às superfícies, além do mais, mesmo esta espécie sendo altamente

acidogênica, seu desenvolvimento não é prejudicado, uma vez que, apresenta tolerância a pH ácidos (Quivey et al., 2000; Bowen, Koo, 2011).

Em biofilmes polimicrobianos compostos por *C. albicans* e *S. mutans*, a bactéria parece favorecer o desenvolvimento do biofilme de *C. albicans* (Pereira-Cenci et al., 2008). Estudos sobre infecção de cárie já demonstraram que há uma associação direta entre esses dois micro-organismos relacionando-os com o desenvolvimento desta doença (Marchant et al., 2001; de Carvalho et al., 2006; Klinke et al., 2011).

2.1.5 Associação entre *C. albicans* e *Pseudomonas aeruginosa*

P. aeruginosa é um patógeno oportunista capaz de causar severas infecções hospitalares em pacientes imunocomprometidos (Chen et al., 2014).

Este micro-organismo apresenta capacidade de formar biofilme, uma vez que, suas células podem se agregar facilmente e sintetizar matriz extracelular, composta por proteínas, ácido nucleico e polissacarídeos (Davey, O'Toole, 2000; Mah, O'Toole, 2001; Chen et al., 2014). A formação de biofilme por *P. aeruginosa* é mediada por moléculas de *cyclic-di-GMP*, responsáveis por promover a transição da forma móvel para séssil, com isso, é induzido o aumento da produção de matriz extracelular e diminuição da motilidade flagelar deste micro-organismo (Baraquet, Harwood, 2013; Kuchma et al., 2012). Além disso, esta bactéria pode produzir um tipo de enzima, relacionada ao seu fator de virulência, conhecida por fenazina (Denning et al., 2003; Rada, Leto, 2013). Esta enzima pode afetar células eucarióticas, incluindo as células fúngicas, como foi demonstrado por Morales et al. (2013), onde altas concentrações de fenazina interferiram tanto no processo de respiração celular como na formação de hifas em *C. albicans*. Assim, parece que

esta enzima pode regular o crescimento de células fúngicas em biofilme polimicrobiano. Em adição, na interação de *C. albicans* com *P. aeruginosa* em biofilme pode ocorrer o estímulo da produção de um pigmento avermelhado derivado da fenazina bacteriana que se acumula no interior da célula fúngica (Morales et al., 2010b).

Na cavidade oral, esta bactéria Gram-negativa pode causar uma forma mais agressiva de periodontite justamente pela sua presença no biofilme supragengival (da Silva-Boghossian et al., 2011). A partir da cavidade oral, *P. aeruginosa* pode ser disseminada sistemicamente e provocar infecção respiratória, principalmente em pacientes hospitalizados e imunodebilitados (Raghavendran et al., 2007).

Foi verificado que em casos de pacientes com fibrose cística, uma doença hereditária fortemente associada com infecções pulmonares crônicas recalcitrantes, é comum a co-infecção de *P. aeruginosa* com outros micro-organismos, sendo este, um fator impactante para o curso desta doença e seu tratamento (Leclair, Hoga, 2010; Delhaes et al., 2012; Chen et al., 2014). A associação de *P. aeruginosa* com *C. albicans* pode provocar agravamento desta doença, com rápido aumento da perda da função pulmonar nestes pacientes (Chotirmall et al., 2010).

2.2 *Rosmarinus officinalis* L. (alecrim)

R. officinalis L. é conhecido popularmente no Brasil por alecrim (*rosemary*, em inglês), trata-se de uma espécie vegetal perene lenhosa, da família Lamiaceae, originada da região Mediterrânea, que atualmente pode ser encontrada e cultivada em todos os continentes como planta aromática e ornamental, sendo suas folhas comumente

utilizadas como condimento, bem como, para fins medicinais (Rašković et al., 2014).

Foi demonstrado por meio de cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massa e espectroscopia por ressonância magnética que os principais constituintes do óleo essencial de alecrim são 1,8-cineol (52.2%), cânfora (15,2%) e α -pineno (12,4%) (da Silva et al., 2015). Rašković et al. (2014) também comprovaram que estes biocompostos estão em maior quantidade no vegetal, sendo 1,8-cineol (43,8%), cânfora (12,5%) e α -pineno (11,5%).

É possível encontrar na literatura estudos que relataram algumas atividades farmacológicas de *R. officinalis*, como efeito antimicrobiano (Guerra-Boone et al., 2015), antibacteriano (Irshaid et al., 2014), antifúngico (Gauch et al., 2014; da Silva et al., 2015), antimicobacteriano (Abuzeid et al., 2014), anti-inflamatório (Rocha et al., 2015; Silva et al. 2015), antitumoral (Wang et al., 2012), antioxidante (Motlagh et al., 2014; Dias et al., 2015; Guerra-Boone et al., 2015), antimutagênico (Felicidade et al. 2014), neuroprotetivo (Lin et al, 2014; Wu et al., 2015), cardioprotetor (Li XL et al., 2014), modulador de estresse oxidativo (El-Demerdash et al., 2016; Sebai et al., 2015) e DNA-protetivo (Horvathova et al., 2014).

2.2.1 Atividade antimicrobiana

A ação antimicrobiana de *R. officinalis* L. tem sido relatada sobre os micro-organismos como *C. albicans* (Chifiriuc et al., 2012; Smullen et al., 2012; Gauch et al., 2014), *S. aureus* (Smullen et al., 2012; Wang et al., 2012; Fratini et al., 2014), *S. mutans* (Smullen et al., 2012), *E. faecalis* (Smullen et al., 2012; Petrolini et al., 2013) e *P. aeruginosa* (Smullen et al., 2012; Petrolini et al., 2013), entre outros.

R. officinalis L. apresentou capacidade de interferir na filamentação *in vitro* de amostras clínicas de *C. albicans*, um importante fator de virulência desta levedura (Gauch et al., 2014). Neste estudo, a avaliação foi conduzida em 10 isolados de *C. albicans* provenientes de próteses dentárias. Para tanto, após indução da filamentação das leveduras, com soro fetal bovino em caldo Sabouraud, foi utilizado o óleo essencial de alecrim para verificação da inibição do desenvolvimento deste fator de virulência. Foi observado que a adição do óleo essencial de *R. officinalis* L. na incubação dos isolados promoveu total inibição da filamentação das leveduras, uma vez que, no grupo em que não foi adicionado o óleo essencial foi notado que metade dos isolados apresentaram 100% de formação de tubo germinativo e na outra metade houve variação entre 63% e 94%.

O óleo essencial de *R. officinalis* L. apresentou efeito antibacteriano para *S. aureus* e *S. xylosus*. Este produto vegetal promoveu inibição do crescimento das bactérias, demonstrado por teste de disco-difusão em ágar, onde foram gerados halos de inibição de 6,3 mm para *S. aureus* e de 8 mm para *S. xylosus* (Fratini et al., 2014).

O extrato hidroalcoólico obtido a partir de folhas de *R. officinalis* L. e suas frações proporcionaram efeito inibitório e, em alguns casos, efeito bactericida para cepas de *E. faecalis* e *P. aeruginosa* (Petrolini et al., 2013). Com teste de microdiluição em caldo, o extrato bruto, bem como, suas frações n-hexano (F1), hexano/acetato de etila (75:25 v/v) (F2), hexano/acetato de etila (50:50 v/v) (F3), acetato de etila (F4), acetato de etila/etanol (75:25 v/v) (F5), acetato de etila/etanol (50:50 v/v) (F6) e etanol (F7), foram avaliados sobre uma cepa de referência e uma clínica para cada espécie. Os resultados demonstraram que o extrato bruto e suas frações F3, F2, F4-F7, inibiram o crescimento da cepa de referência de *P. aeruginosa* e somente F1 e F3, inibiram o crescimento da cepa clínica. Em relação às cepas de *E. faecalis*, o extrato bruto e as frações F4, F5 e F3 proporcionaram efeito bactericida à

cepas de referência e também ao isolado clínico, contudo, a fração F2 proporcionou apenas efeito inibitório para este último.

O extrato das folhas de *R. officinalis* L. demonstrou significativa ação *in vitro* sobre *S. mutans*, em relação à formação de biofilme, à redução da atividade de fatores de virulência e também sobre culturas planctônicas (Smullen et al., 2012). Adicionalmente, os autores também constataram efeito inibitório sobre outras espécies microbianas, como *C. albicans*, *S. aureus*, *E. faecalis*, *P. aeruginosa*, *Actinomyces* spp., *Streptococcus* spp., *Escherichia coli*, *Lactobacillus acidophilus* e *Veillonella* spp. Em relação ao *S. mutans*, os autores demonstraram que após 1 h de incubação em meio líquido acrescido de extrato de *R. officinalis* L. houve redução da viabilidade celular do biofilme de 10 vezes, aumentando para 100 vezes após 6 h, em comparação ao controle. Além disso, comprovaram que o biofilme de *S. mutans* teve seu desenvolvimento afetado com cerca de 87,5% de inibição.

A atividade antibiofilme de um sistema nanobiológico, formado pela união do óleo essencial de *R. officinalis* L. com nanopartículas compostas por um núcleo de óxido de ferro (Fe_3O_4) e um revestimento de ácido oleico (CHCl_3), foi verificada sobre um isolado clínico de *C. albicans* e *Candida tropicalis* (Chifiriuc et al., 2012). Nesse estudo, cateteres foram revestidos ou não com esse sistema e a capacidade do desenvolvimento dos biofilmes fúngicos foi analisada *in vitro*. Com auxílio de microscopia confocal de varredura a laser, foi possível notar significativa redução da aderência das células fúngicas ao material, bem como, a interferência no desenvolvimento do biofilme, com total ausência de aderência nos períodos de 48 e 72 h. Em contrapartida, nas peças não tratadas foi observada formação de biofilme composto inicialmente apenas por leveduras (24 h) e posteriormente por formas filamentosas (72 h). Com isso, foi constatado que este sistema nanobiológico proporcionou redução acentuada do biofilme de *C. albicans* de aproximadamente 85% após 48 h, e de cerca de 98%, após 72 h.

O óleo essencial de *R. officinalis* L. e alguns de seus biocompostos como α -pineno, β -pineno e 1,8-cineol apresentaram efeito antibacteriano sobre *S. aureus* (Wang et al., 2012). Neste estudo, foi constatado que o óleo essencial proporcionou acentuada queda no número de unidades formadoras de colônia por mililitro (UFC/mL), após 12 h de exposição, com eliminação total após 24 h. Em relação aos biocompostos, *α -pineno* apresentou efeito bactericida, após 12 h, no entanto, foi observada queda do número de UFC/mL a partir de 8 h de contato, *β -pineno* também foi bactericida após 24 h, com significativa redução de UFC/mL após 12 h, e *1,8-cineol*, apresentou acentuada queda de UFC/mL a partir de 24 h de exposição e eliminação total após 30 h.

2.2.2 Citotoxicidade para células tumorais humanas

Linhagens de células tumorais humanas (CTH) de câncer ovariano (SK-OV-3 e HO-8910) e de carcinoma hepatocelular (Bel-7402), cultivadas *in vitro*, apresentaram diminuição de sua viabilidade com aplicação do óleo essencial de *R. officinalis* L. ou de seus biocompostos, com demonstração de dose-dependência, em estudo realizado com aplicação do teste colorimétrico MTT [brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-yl)-2,5-difeniltetrazólio] (Wang et al., 2012). Neste estudo, foi comprovada redução significativa da viabilidade celular destas as linhagens conforme o aumento da concentração dos produtos vegetais avaliados.

Avaliando a atividade citotóxica do extrato das folhas de *R. officinalis* L. sobre linhagens de CTH de câncer de colo (SW620 e DLD-1) e de câncer de pâncreas (MIA-PaCa-2 e PANC-1), com teste MTT, ficou demonstrado que PANC-1 apresentou maior resistência à ação citotóxica do extrato, seguida por MIA-PaCa-2. As linhagens de SW620 e DLD-1 apresentaram maior sensibilidade aos efeitos deste

extrato (González-Vallinas et al., 2014). Adicionalmente, foi observado citotoxicidade dose-dependente sobre as linhagens de câncer de colo, com acentuada queda de viabilidade celular de SW620, que passou de 90% para 20%. Por outro lado, PANC-1 demonstrou menor taxa de redução, uma vez que, passou de aproximadamente 80% para cerca de 60%. Contudo, ambas as linhagens foram significativamente afetadas pelo extrato vegetal.

O extrato de *R. officinalis* L. teve sua atividade citotóxica avaliada sobre duas linhagens de CTH de câncer de próstata (22Rv1 e LNCaP) (Petiwala et al., 2014). Neste estudo, o extrato apresentou um percentual de inibição da proliferação de 22Rv1 em cerca de 80% e de aproximadamente 95% para LNCaP. Em adição, foi demonstrado que o percentual da viabilidade celular diminuiu ao passo que a concentração do extrato aumentava, sendo constatada queda da viabilidade celular de 22Rv1 entre 30% e 90% e de 10% a 90% para LNCaP, dependendo da dose empregada .

2.2.3 Atividade anti-inflamatória

É necessário levar em consideração que o processo inflamatório é uma estratégia essencial do sistema imune contra patógenos, porém em alguns casos pode promover danos ao hospedeiro.

Neste processo, neutrófilos circulantes são as primeiras células a serem recrutadas ao foco da lesão no tecido, por ativação de proteínas plasmáticas ou por mediadores quimiotáticos secretados por células residentes ativadas. Após o reconhecimento do patógeno pelos neutrófilos, ocorre a ativação destas células defensoras, com isso, pode ocorrer aumento da secreção de citocinas, que conseqüentemente atrairão ao local da infecção mais células fagocitárias, além da expressão

de receptores para estes agentes na superfície destas células. Desta forma, estes elementos pró-inflamatórios poderão contribuir para a destruição do agente invasor que desencadeou este processo de defesa (Li JL, Ng, 2012; Silva et al., 2015).

Em um processo inflamatório pode ser gerados danos ao tecido do hospedeiro, por isso, o bloqueio deste mecanismo tem sido avaliado, como por exemplo, a capacidade de produtos naturais atuarem sobre a migração de células, bem como, sobre a produção de mediadores químicos e fagocitose (de Oliveira et al., 2013, 2014; Silva et al., 2015).

O potencial anti-inflamatório de *R. officinalis* L., tanto *in vitro* como *in vivo*, tem sido verificado em relação a sua capacidade de controle da produção de alguns elementos relacionados à inflamação como citocinas, fatores de crescimento, óxido nítrico (NO) e prostaglandinas, além de verificar sua ação direta sobre a migração desnecessária de células de defesa. Esses estudos buscam avaliar uma alternativa para inibir esses mecanismos que, por alguma razão, se encontram desajustados biologicamente e tendem a ser danosos ao hospedeiro.

Essa funcionalidade de *R. officinalis* L. pode ser verificada no estudo de Yu et al. (2013), onde foi avaliado o uso de extratos nas frações metanólica e hexânica deste vegetal sobre macrófagos de camundongo (RAW 264.7) estimulados por lipopolissacarídeo (LPS). Esses autores demonstraram que o extrato metanólico foi capaz de diminuir os níveis da enzima óxido nítrico sintetase (NOS), responsável pela síntese de NO, contudo foi analisado que não houve interferência nos níveis de ciclo-oxigenase-2 (COX-2), enzima responsável pela produção de prostaglandina. Por outro lado, o extrato hexânico de *R. officinalis* L., proporcionou apenas a diminuição dos níveis de COX-2. Em relação aos níveis de prostaglandina E2 (PGE2) analisados, o extrato metanólico proporcionou considerável redução, porém com uso da fração hexânica sua supressão foi maior. Esses autores demonstraram ainda

que os níveis de fator de necrose tumoral alfa (TNF- α) também foram inibidos fortemente com utilização do extrato hexânico de *R. officinalis* L. Com isso, puderam constatar que extratos de *R. officinalis* L., apresentaram efeito preventivo à infecção, em caso de estímulo celular à produção de mediadores químicos.

A produção destes mediadores químicos inflamatórios ocorre graças ao estímulo que certas células relacionadas diretamente com o processo de inflamação recebem, desta forma, o efeito pode ser gradualmente aumentado com a chegada desnecessária de mais células defensoras ao sítio da infecção.

A ação do extrato aquoso do *R. officinalis* L. na migração de neutrófilos do sangue ao tecido inflamado e produção de mediadores quimiotáticos e estresse oxidativo ocasionados por essa migração foi analisada por Silva et al. (2015). Neste estudo, em ratos Wistar tratados oralmente com extrato de *R. officinalis*, foi induzida inflamação subcutânea com aplicação de carragenina, um polissacarídeo proveniente de algas marinhas vermelhas (*Chondrus crispus*) comumente utilizado para avaliação de atividade anti-inflamatória. A partir de exsudato inflamatório, foram realizadas análises do fluxo de leucócitos, produção de mediadores inflamatórios, como PGE2, TNF- α , interleucina 6 (IL-6), leucotrieno B4 (LTB4), citocina indutora de quimiotaxia de neutrófilos 1 (CINC-1) e produção de estresse oxidativo. Ficou evidente que o extrato de *R. officinalis* L., proporcionou redução na migração de neutrófilos, bem como, diminuição dos níveis de mediadores inflamatórios no exsudato. Em adição, ficou comprovada *in vitro* a diminuição da atração de neutrófilos e da produção de NO. Com isso, os autores sugeriram a possibilidade de aplicação terapêutica do extrato de *R. officinalis* L. em casos de reações inflamatórias agudas

2.2.4 Atividade antimutagênica

Efeitos mutagênicos são caracterizados pela presença de danos irreparáveis à molécula de ácido desoxirribonucleico (DNA) que continuamente é transmitido à geração seguinte durante a divisão celular.

O DNA é um dos principais alvos de espécies reativas de oxigênio (ROS), como radical hidroxila (OH^\bullet), ânion superóxido ($\text{O}_2^{\bullet-}$), peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e oxigênio singleto, gerados intrinsecamente ou extrinsecamente nas células por estresse oxidativo, indicando a fase inicial na mutagênese e carcinogênese, podendo incluir danos como ligação cruzada na síntese proteica, quebras da molécula de DNA e geração de sítios alcali-lábeis (local na cadeia nucleotídica onde ocorre sua ruptura, quando o DNA é colocado em pH elevado). Contudo, além de afetar o DNA, esses radicais livres podem também danificar outras macromoléculas, como membranas celulares, proteínas e ácido ribonucleico (RNA), causando diversos problemas relacionados com doenças pulmonares, renais e hepáticas, bem como, aterosclerose, diabetes melitus e envelhecimento. No entanto, enzimas antioxidantes, como catalase, superóxido dismutase, glutatona redutase e glutatona peroxidase trabalham a favor de um balanço oxidativo-antioxidativo (Elejalde, 2001; Kawanishi et al., 2002; Shi et al., 2004; Manke et al., 2013).

O estudo do efeito protetor de produtos naturais aos possíveis danos oxidativos ao DNA, utilizados como uma ferramenta terapêutica alternativa pode ser uma estratégia eficiente para solucionar casos de mutagênese.

Razavi-Azarkhiavi et al. (2014) puderam constatar o efeito protetor do extrato etanólico de *R. officinalis* contra danos ao DNA induzido *in vitro* por H_2O_2 . Neste estudo, onde foi utilizado o teste do cometa, ensaio proposto inicialmente por Östling e Johanson em 1984,

que consiste em quantificar os danos na molécula de DNA por verificação do material genético migrante a partir do núcleo que se apresenta em formato semelhante à cauda de um cometa, foi constatado que houve redução do dano ao DNA na cultura celular de linfócito humano tratado previamente com os extrato de *R. officinalis* L., uma vez que, no grupo não tratado foi observado percentual de formação de cauda de 55%, contudo, a utilização dos extratos proporcionou redução para cerca de 5%. Com isso, foi possível constatar ausência de genotoxicidade do extrato de *R. officinalis*, no grupo sem indução de mutagênese (apenas extrato), além de efeito protetor no grupo onde foi induzido dano ao DNA por H₂O₂ e houve tratamento com extrato de *R. officinalis* L.

Um biocomposto presente em espécies da família Lamiaceae, incluindo *R. officinalis* L. e *T. vulgaris* L., o ácido rosmarínico, também apresentou efeito protetor *in vitro* aos danos ocasionados por doxorubicina (DXR), um indutor de genotoxicidade (Furtado et al., 2010). Neste estudo, fibroblastos pulmonares de *hamster* chinês (V79), foram induzidos à mutagênese por DXR e tratados com ácido rosmarínico. A análise do efeito protetor deste biocomposto vegetal foi verificada com o teste do cometa e micronúcleo, este último corresponde em quantificar o material desprendido do núcleo celular sem quantificação da cauda exibida no teste do cometa. Desta forma, os autores constataram no grupo com indução de mutagênese por DXR e tratado com o ácido rosmarínico, significativa redução da frequência de micronúcleos de até 89% e diminuição da extensão do dano ao DNA, neste mesmo percentual, pelo teste do cometa. Analisando isoladamente o biocomposto vegetal, foi observado que este não apresentou efeito genotóxico, uma vez que, os níveis de material genético extranuclear foram semelhantes ao grupo controle e significativamente menores em comparação ao grupo DXR, em relação a frequência de micronúcleos e migração de DNA.

2.3 *Thymus vulgaris* L. (tomilho)

T. vulgaris L., conhecido popularmente no Brasil por tomilho (*thyme*, em inglês), trata-se de uma planta aromática perene originada da região Mediterrânea, pertencente também à família Lamiaceae (Ismaili et al., 2004). O tomilho vem sendo utilizado pela população mundial como planta aromática, na culinária, como conservante de alimentos, além de seu lado medicinal também ser explorado (Jamali et al., 2012).

Thymus spp apresentam uma gama de biocompostos responsáveis por inúmeras atividades farmacológicas. Foi verificado que o óleo essencial de diferentes espécies de tomilho pode apresentar como maiores constituintes os terpenos timol, carvacrol, *p*-cimeno, γ -terpineno, cariofileno, linalol e borneol (Jamali et al., 2012).

Seus efeitos benéficos foram descrito na literatura, com apresentação de atividades antibacteriana (Al Laham, Al Fadel, 2014; de Las Mercedes et al., 2015), antiviral (Sánchez, Aznar, 2015), antifúngica (Maissa, Walid, 2015; Kohiyama et al., 2015; Khaledi et al., 2015), anti-inflamatória (Aazza et al., 2014), anticâncer (Al-Menhali et al., 2015), anti-hipertensiva (Alamgeer et al., 2014), antioxidante (Aazza et al., 2014), antitumoral (Aazza et al., 2014), pró-apoptótica em célula tumoral (Esmaeili et al., 2014), anti-proliferativa (Esmaeili-Mahani et al., 2014), anti-nematódeo (Giarratana et al., 2014).

2.3.1 Atividade antimicrobiana

A ação antimicrobiana *T. vulgaris* L. pode ser observada sobre algumas espécies como *C. albicans* (Belaqziz et al., 2012; Jamali et

al., 2012; Khan et al., 2014), *S. aureus* (Sienkiewicz et al., 2011; Belaqziz et al., 2012), *E. faecalis* (Sienkiewicz et al., 2011) e *P. aeruginosa* (Sienkiewicz et al., 2011; Belaqziz et al., 2012), entre outras.

Foi relatado que sete espécies de *Thymus* apresentaram ação anti-*Candida*, sendo avaliados os óleos essenciais de *T. broussonetii*, *T. ciliatus*, *T. leptobotrys*, *T. maroccanus*, *T. pallidus*, *T. satureioides* e *T. serpyllum* (Jamali et al., 2012). Para tanto, por meio de disco-difusão em ágar foi verificado o perfil antifúngico destes óleos essenciais sobre *C. albicans*, *C. krusei*, *C. glabrata* e *C. parapsilosis*. Foi observado que todos os óleos essenciais, derivados das sete espécies, proporcionaram inibição de crescimento das leveduras, apresentando halos de inibição superiores ao fluconazol, exceto *T. serpyllum* que apresentou ação inibitória inferior a este antifúngico.

O óleo essencial de *T. vulgaris* L. proporcionou a inibição *in vitro* da formação de biofilme de isolados clínicos de *C. albicans*, resistentes a antifúngicos (Khan et al., 2014). Neste estudo, foram analisadas concentrações inferiores à concentração inibitória mínima (CIM) deste óleo essencial sobre 18 isolados clínicos de *C. albicans* antifúngico-resistentes. Os autores pontuaram a capacidade de formação de biofilme como “fraca”, “moderada” ou “forte”, com isso, dentre os isolados clínicos, 13 foram classificados com capacidade “forte” ou “moderada”, três com capacidade “fraca” e dois não formaram biofilme. Adicionalmente, sobre as cepas caracterizadas com capacidade “forte” foram aplicadas as sub-CIM do óleo essencial. Com isso, foi verificado que essas concentrações proporcionaram em média reduções significativas entre 7,5% e 25%.

A susceptibilidade de *S. aureus*, *P. aeruginosa* e *C. albicans* ao óleo essencial de *T. vulgaris* L. foi demonstrada por meio de disco-difusão em ágar (Belaqziz et al., 2012). Neste estudo, a ação do óleo essencial sobre *S. aureus* foi semelhante à gentamicina e tetraciclina. Em relação à *P. aeruginosa*, foi observado que a ação do óleo

essencial foi menor em comparação à gentamicina (23 mm), porém com efeito inibitório semelhante à tetraciclina. A ação do óleo essencial sobre a amostra de *C. albicans* foi menor em comparação à tetraciclina. Desta forma, ficou evidenciado que o óleo essencial de *T. vulgaris* L. pode, em alguns casos, atuar semelhantemente a um antibiótico como gentamicina ou tetraciclina.

A ação do óleo essencial de *T. vulgaris* L. sobre isolados clínicos de *S. aureus*, *Enterococcus* spp (*E. faecalis*, *E. faecium* e *E. durans*), *E. coli* e *P. aeruginosa*, com características de resistência ou sensibilidade a alguns antimicrobianos foi avaliada *in vitro* com aplicação de teste de disco-difusão em ágar (Sienkiewicz et al., 2011). Para tanto, foram utilizadas 30 isolados clínicos de *S. aureus*, *Enterococcus* spp, *E. coli* e *P. aeruginosa*. Neste estudo, ficou constatado que todos os isolados de *S. aureus*, *Enterococcus* spp e *P. aeruginosa* apresentaram susceptibilidade ao óleo essencial de *T. vulgaris* L., entretanto, apenas dois isolados clínicos de *E. coli* foram tolerantes ao óleo essencial.

2.3.2 Citotoxicidade para células tumorais humanas

Estudos realizados com *T. vulgaris* L. demonstraram sua efetiva atuação sobre CTH, uma vez que, proporcionaram significativa inibição de seu desenvolvimento em testes *in vitro*.

O extrato hidroalcoólico de tomilho foi citotóxico para CTH de adenocarcinoma de mama (MCF-7) (Esmaeili-Mahani et al., 2014). Neste estudo, as células MCF-7 foram cultivadas com diferentes concentrações do extrato vegetal, bem como, com a junção desse extrato com o anticâncer vincristina. Os resultados apontaram que o extrato sozinho proporcionou citotoxicidade dose-dependente às células MCF-7, com redução de cerca de 50% de viabilidade celular, já na interação

medicamentosa os resultados foram menores, com redução de aproximadamente 35% da viabilidade celular da cultura.

O extrato etanólico de *T. vulgaris* L. demonstrou efeito citotóxico para CTH de leucemia monocítica aguda (THP-1) com controle dose-dependente de sua proliferação *in vitro* (Ayesh et al., 2014). Neste estudo, THP-1 foram expostas a diferentes concentrações do extrato. Com isso, foi observado que a viabilidade celular de THP-1 diminuiu significativamente ao passo que as concentrações eram aumentadas. O extrato de *T. vulgaris* L. demonstrou afetar esta linhagem tumoral drasticamente, alcançando níveis de eliminação de até 100%, em doses elevadas. Por outro lado, em doses inferiores, foi constatado efeito oposto, ocorrendo indução da proliferação celular, uma vez que, a viabilidade celular chegou a 120%.

2.3.3 Atividade anti-inflamatória

A capacidade do efeito anti-inflamatório de extratos oleosos de *Thymus* spp (*T. vulgaris*, *T. zygis* e *T. hyemalis*) foi analisada por Ocaña e Reglero (2012). Neste estudo, THP-1 foram diferenciados em macrófagos por incubação com acetato miristato de forbol (PMA) e ativados com lipoproteínas de baixa densidade oxidada (LDL-oxi) e os níveis de citocinas pró-inflamatórias, como IL-1 β , IL-6 e TNF- α , e anti-inflamatória, IL-10, foram analisados. Após exposição ao agente estimulante (LDL-oxi) e tratamento com extratos de tomilho, por 24 h, foi observada significativa redução da produção das citocinas pró-inflamatórias. Em adição, foi constatado que após 48 h de tratamento, os níveis de IL-1 β e TNF- α foram semelhantes ao nível basal de células não ativadas e os níveis de IL-10 foram significativamente aumentados, após tratamento de 24 h. Estes autores também verificaram que a expressão

gênica de IL-1 β , IL-6 e TNF- α aumentou no grupo de células ativadas por LDL-oxi, por outro lado, nos grupos tratados por 24 h, a expressão de IL-1 β e TNF- α diminuiu e a expressão de IL-6 foi semelhante ao grupo de células não ativadas por LDL-oxi. Contudo, após 48 h de tratamento houve redução da expressão gênica de todas as citocinas pró-inflamatórias analisadas. Em relação a IL-10, sua expressão foi duplamente aumentada no grupo tratado por 24 h. Desta forma, ficou evidente o potencial anti-inflamatório dos extratos de *Thymus* spp.

O óleo essencial de *T. vulgaris* L. também foi capaz de promover efeito anti-inflamatório, como demonstrado no estudo realizado por Tsai et al. (2011), onde utilizaram modelo celular de THP-1 ativados por LPS. A quantificação dos níveis de IL-1 β , IL-8 e TNF- α foi realizada após tratamento por 24 h com o óleo essencial e exposição ao LPS por 48 h. Primeiramente, foi constatado que as células estimuladas por LPS apresentaram para estas citocinas níveis imensamente superiores em comparação aos níveis apresentados pelo grupo não estimulado por LPS. Em seguida, foi observado que no grupo tratado com o óleo essencial, houve significativa redução destas citocinas, sendo que os níveis de IL-1 β foram menores que IL-8, que foram menores que TNF- α . Em adição, os autores puderam demonstrar que este óleo essencial promoveu ação direta sobre a enzima 5-lipoxigenase, responsável pela produção de leucotrienos, reforçando ainda mais o potencial anti-inflamatório de *T. vulgaris* L.

2.3.4 Atividade antimutagênica

Biocompostos de *T. vulgaris* L., como timol e carvacrol, tem sido estudados no intuito de verificar seu efeito protetor em resposta aos danos proporcionados pelo estresse oxidativo ao DNA (Ündeger et

al., 2009). A análise do efeito protetor destes biocompostos foi realizada *in vitro* sobre a linhagem V79, que foi estimulada à mutagênese com H₂O₂, porém tratada separadamente com cada biocomposto de *T. vulgaris* L. Neste estudo, pode ser observado que nos grupos tratados com ambos os biocompostos, houve redução da migração de DNA, em comparação ao grupo estimulado por H₂O₂ e não tratado. Os autores constataram também que a produção de ROS foi maior com aplicação de H₂O₂, porém o uso de timol os níveis foram similares ao grupo controle.

No estudo de Buyukleyla e Rencuzogullari (2009), o efeito genotóxico do timol também foi analisado. Para tanto, os autores utilizaram linfócitos periféricos tratados com o biocomposto e estimulados pelo agente mutagênico metanossulfonato de etila (MSE). Ficou constatado que a frequência de micronúcleos foi maior tanto com aplicação do biocomposto como do MSE, em comparação ao grupo controle, porém as células tratadas com timol promoveram exibição de menor frequência de micronúcleos que MSE. Constataram também que ao decorrer do tempo de 48 h, a frequência de micronúcleos foi maior que no tempo de 24 h, para MSE, porém, em relação ao timol, a frequência foi similar.

Com esses resultados promissores da utilização dos extratos de *R. officinalis* L. e *T. vulgaris* L., nossa busca foi por encontrar atividade antimicrobiana, principalmente sobre biofilmes mono e polimicrobianos. Além de se obter concentrações capazes de não prejudicar o desenvolvimento de células ou que fossem minimamente citotóxicas para elas e, por outro lado, pudessem afetar o desenvolvimento de células tumorais com inibição de sua proliferação. Promover efeito imunomodulador na produção de citocinas pró-inflamatórias e efeito protetor para o DNA, que poderia ser uma estratégia de combate à mutagênese, que se for controlada, poderá evitar mutações genéticas e conseqüentemente inibir o desenvolvimento de carcinogênese.

3 DETALHAMENTO METODOLÓGICO

3.1 Extratos vegetais

Os extratos de *R officinalis* L. (Mapric, São Paulo, Brasil) e *T. vulgaris* L. (Florien, Piracicaba, Brasil) foram adquiridos comercialmente na concentração de 200 mg/mL em propilenoglicol.

3.2 Atividade antimicrobiana

3.2.1 Micro-organismos

A avaliação da atividade antimicrobiana dos extratos foi realizada sobre cepas de referência (ATCC - *American Type Culture Collection*) de *C. albicans* (ATCC 18804), *S. aureus* (ATCC 6538), *E. faecalis* (ATCC 4083), *S. mutans* (ATCC 35688) e *P. aeruginosa* (ATCC 15442) provenientes do Laboratório de Microbiologia e Imunologia – ICT/UNESP. As cepas foram mantidas em congelamento (-80°C) em caldo *Brain Heart Infusion* (BHI – Himedia, Mumbai, Índia) com 20% de glicerol, para as bactérias, e em caldo *Yeast Extract Peptone Dextrose* (YPD – Himedia) com 16% de glicerol, para *C. albicans*.

3.2.2 Ação sobre culturas planctônicas

Para a determinação das concentrações inibitória mínima (CIM) e microbicida mínima (CMM) dos extratos foi utilizado o método de microdiluição em caldo, segundo *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI), normas M7-A6 (CLSI, 2003) e M27-A21 (CLSI, 2002) suplementada por M27-S4 (CLSI, 2012). Primeiramente, as bactérias foram cultivadas em ágar BHI (Himedia) e *C. albicans* em ágar Sabouraud-dextrose (SD – Himedia) por 24 h a 37°C, com 5% de CO₂ para *S. mutans*. Em seguida, suspensões microbianas foram preparadas em solução salina estéril (NaCl 0,9%). Com auxílio de espectrofotômetro (Micronal, São Paulo, Brasil) a turbidez das suspensões foram ajustadas para 1×10^6 UFC/mL (unidades formadoras de colônia por mililitro). O meio de cultura utilizado para crescimento das bactérias foi caldo Mueller Hinton (Himedia) e para *C. albicans* foi utilizado caldo RPMI 1640 (Himedia) com glutamina, sem bicarbonato e com indicador vermelho de fenol, tamponado a pH $7,0 \pm 0,1$ com MOPS [ácido 3-(N-morfolino) propanosulfônico] (Sigma-Aldrich, St. Louis, EUA). As microdiluições do extrato foram realizadas em placas de 96 poços (TPP, Trasadingen, Suíça), onde foram adicionados 100 µL de meio de cultura em 10 poços e 100 µL do extrato de *R. officinalis* L (200 mg/mL) ou *T. vulgaris* L. apenas no primeiro poço de onde foi iniciada uma série de diluições (1:2) até a décima diluição. Em seguida, foram adicionados em todos os poços 100 µL da suspensão microbiana padronizada. Com isso, os inóculos alcançaram aproximadamente as concentrações de 5×10^5 UFC/mL, para as bactérias, e de 5×10^2 a $2,5 \times 10^3$ UFC/mL, para *C. albicans*. E as concentrações do extrato foram diluídas de 50 a 0,09 mg/mL. Poços de controle de crescimento (C-), meio mais inóculo, e do meio (C+), sem inóculo, foram adicionados. Após incubação de 24 h, a CIM foi determinada no último poço da microplaca na diluição que não foi

observada turvação. Para determinação da CMM, 100 µL da CIM e de poços anteriores a ela foram semeados em ágar BHI ou SB. Após 48 h de incubação ela foi determinada na menor concentração onde não houve crescimento microbiano.

3.2.3 Ação sobre biofilmes microbianos

3.2.3.1 Grupos experimentais

A ação dos extratos foi avaliada *in vitro* sobre biofilmes monomicrobianos de *C. albicans*, *S. aureus*, *E. faecalis*, *S. mutans* e *P. aeruginosa*, bem como, em associações polimicrobianas de *C. albicans* com cada uma das bactérias (Quadro 1).

Quadro 1 - Distribuição dos grupos experimentais e associações interespecíficas de micro-organismos em biofilme *in vitro*

Número de espécies	Grupo	Micro-organismos	
1	<i>Ca</i>	<i>C. albicans</i>	
	<i>Sa</i>	<i>S. aureus</i>	
	<i>Ef</i>	<i>E. faecalis</i>	
	<i>Sm</i>	<i>S. mutans</i>	
	<i>Pa</i>	<i>P. aeruginosa</i>	
2	<i>Ca+Sa</i>	<i>C. albicans</i>	<i>S. aureus</i>
	<i>Ca+Ef</i>	<i>C. albicans</i>	<i>E. faecalis</i>
	<i>Ca+Sm</i>	<i>C. albicans</i>	<i>S. mutans</i>
	<i>Ca+Pa</i>	<i>C. albicans</i>	<i>P. aeruginosa</i>

3.2.3.2 Formação dos biofilmes e tratamento com os extratos

Os microorganismos foram primeiramente cultivados em meio sólido (ágar BHI ou SD) e em seguida em meio líquido (caldo BHI ou caldo *Yeast Nitrogen Base* – YNB, Himedia) por 24 h a 37°C (CO₂ 5% para *S. mutans*). A suspensão microbiana gerada foi centrifugada em 2000 rpm/10 min (MPW-350, Varsóvia, Polônia), o sobrenadante foi descartado e o *pellet* suspenso em solução salina, sendo realizado por duas vezes este procedimento. Posteriormente, a turbidez desta suspensão foi ajustada a 10⁷ UFC/mL com auxílio de espectrofotômetro (Micronal) e 200 µL/poço desta suspensão foram distribuídos em placas de 96 poços. As placas foram levadas para incubação sob agitação (37°C; 75 rpm – Quimis, Diadema, Brasil) por 90 min, para adesão inicial dos microorganismos. Em seguida, o sobrenadante foi descartado e foram adicionados 200 µL de caldo BHI ou YNB. As placas foram

incubadas por 48 h, para a formação dos biofilmes, porém após 24 h o meio de cultura foi substituído por meio fresco.

Os biofilmes polimicrobianos foram formados da mesma forma, porém foram adicionadas partes iguais das suspensões padronizadas, ou seja, 100 µL de cada uma. Para o cultivo nos poços, também foram adicionados partes iguais de BHI e YNB, 100 µL de cada um.

Após 48 h, os biofilmes formados foram expostos por 5 min ao extrato de *R. officinalis* L. ou *T. vulgaris* L. (200 mg/mL) (n = 10) e solução salina foi utilizada como controle negativo (n = 10). Células microbianas afetadas com o extrato foram removidas por duas lavagens com solução salina. Em seguida, o biofilme foi desagregado por homogeneizador ultrassônico (Sonopuls HD 2200 – Bandelin Eletronic, Berlin, Alemanha) por 30 s e potência de 25%. A suspensão obtida foi diluída seriadamente (1:10) e foram adicionados 100 µL em ágar BHI ou SD. No caso dos biofilmes polimicrobianos as sementeiras foram utilizados em meios seletivos sendo, SD acrescido de cloranfenicol (1%) para *C. albicans*, ágar BHI acrescido de 75 mg de NaCl/mL de meio para *S. aureus*, ágar *Mitis salivarius* com 20% de sacarose e 0,2 unidades internacionais (UI) de bacitracina por mililitro de meio para *S. mutans*, m-Enterococcus (Difco) para *E. faecalis* e ágar MacConkey (Difco) para *P. aeruginosa*. Após 48 h incubação, foram contadas as UFC e dada sua concentração em UFC/mL.

3.3 Viabilidade celular

3.3.1 Linhagens celulares

A avaliação da citotoxicidade dos extratos foi realizada sobre fibroblastos gengivais humanos (FMM-1), provenientes da Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo (USP, São Paulo, Brasil), macrófagos de camundongo (RAW 264.7), do Banco de Células do Rio de Janeiro - Associação Técnico Científica Paul Ehrlich (APABCAM, Rio de Janeiro, Brasil), linhagem tumoral de carcinoma mamário (MCF-7) e linhagem tumoral carcinoma cervical (HeLa), provenientes do Instituto Adolfo Lutz (São Paulo, Brasil).

3.3.2 Cultivo das células

As células foram mantidas em frascos de cultivo celular (TPP) em meio de Eagle modificado por Dulbecco (DMEM – LGC) com 10% de soro fetal bovino (Invitrogen, Nova York, EUA) e 1% de penicilina-estreptomicina (Gibco, Grand Island, EUA) sob incubação (37°C e CO₂ 5%) e umidade atmosférica. Após subconfluência, RAW 264.7 foi desprendida com varredor celular (TPP) e demais linhagens com tripsina (LGC). Após centrifugação (2000 rpm/5 min – Hermle Z-300 K – Labnet, Edison, EUA) desta suspensão celular o sobrenadante foi descartado e o *pellet* foi suspenso em meio fresco. Com o teste de exclusão por azul de Trypan (0,5%, Sigma-Aldrich) foram quantificadas as células viáveis. Com isso, em placas de 96 poços foram adicionadas 200 µL/poço de DMEM contendo 4 x 10⁴ células viáveis.

3.3.3 Exposição às concentrações dos extratos

Os extratos de *R. officinalis* L. e *T. vulgaris* L. foram diluídos em DMEM nas concentrações de 25, 50 e 100 mg/mL. DMEM sozinho foi utilizado como controle negativo (0 mg/mL), sendo n = 10/grupo experimental. Após incubação de 24 h, cada cultura foi exposta às concentrações do extrato por 5 min. Para descarte de células que não sobreviveram ao tratamento foram feitas lavagens com PBS. Em seguida foram aplicados os testes de viabilidade celular, descritos a seguir.

3.3.4 Teste de MTT

Neste teste, enzimas redutases presentes em células viáveis podem degradar o MTT e gerar o formazan que pode ser quantificado por espectrofotômetro. Para tanto, a solução de MTT [brometo de 3(4,5-dimetiltiazol-2-yl)2,5-difeniltetrazólio] (Sigma Aldrich) foi preparada a 0,5 mg/mL *phosphate buffered* saline (PBS – LGS Biotecnology, Cotia, Brasil), e adicionados 100 µL/poço sobre os biofilmes. Após incubação de 1 h sob abrigo da luz o sobrenadante foi descartado e adicionado 100 µL/poço de dimetilsulfóxido (DMSO - Sigma Aldrich). Nova incubação de 10 min foi realizada, seguida de agitação da placa de 96 poços em mesa orbital (Solab, Piracicaba, Brasil), por mais 10 min. Em seguida, a absorbância dos poços foi dada com auxílio de espectrofotômetro de microplacas (Bio-Tek, Vermont, EUA) a 570 nm. Os dados gerados foram convertidos em percentual de redução de viabilidade celular.

3.3.5 Teste de vermelho neutro (VN)

Este método analisou a incorporação do VN em lisossomos de células viáveis. Para este fim, o pó de VN (Vetec/Sigmaldrich, SP, Brasil) foi suspenso em PBS (20 µg/mL). Foram adicionados 100 µL/poço desta solução sobre as células e após incubação de 2 h, abridas da luz, esta solução foi removida e adicionados 100 µL/poço de álcool etílico puro. A placa foi levada para agitação em mesa orbital (Solab) por 15 min. Em seguida, a absorbância dos poços foi analisada em espectrofotômetro de microplacas (Bio-Tek) a 570 nm. Os valores obtidos foram convertidos em percentual de viabilidade celular.

3.3.6 Teste de cristal violeta (CV)

Por este método foi verificada a coloração do DNA de células viáveis. Primeiramente, as células foram fixadas por 10 min com formaldeído 10% (Synth, SP, Brasil), em seguida, foram adicionados 100 µL/poço de solução de CV (0,2 mg/mL), após suspensão do pó de CV (Synth) em água destilada. Após incubação de 15 min, sob abrigo da luz, o corante foi descartado e os poços foram lavados com água destilada até que não se percebesse a presença do corante. Em cada poço foram adicionados 100 µL de álcool etílico puro e após 10 min de agitação em mesa orbital (Solab) a absorbância dos poços foi lida em espectrofotômetro de microplacas (Bio-Tek) a 570 nm e os valores obtidos foram convertidos em percentual de viabilidade celular.

3.4 Atividade anti-inflamatória

3.4.1 Formação dos grupos experimentais

RAW 264.7 foi cultivada em placa de 24 poços (TPP) na concentração de 5×10^5 células/mL de DMEM por 24 h. No grupo com ausência de LPS de *E. coli* (Sigma-Aldrich), o sobrenadante foi descartado e adicionado extrato de *R. officinalis* L. ou *T. vulgaris* L. diluídos em DMEM, nas concentrações de 25, 50 e 100 mg/mL, DMEM sozinho foi utilizado como controle (0 mg/mL), sendo $n = 10$ /grupo experimental. No grupo com presença de LPS, a essas concentrações foi adicionado 1 μ g/mL de LPS ($n = 10$ /grupo). Após 24 h de exposição, o sobrenadante foi coletado e armazenado em microtubos a -20°C para posterior análise de citocinas pró-inflamatórias (IL-1 β e TNF- α).

3.4.2 Ensaio imunoenzimático ELISA

Os níveis de citocinas pró-inflamatórias, IL-1 β e TNF- α , provenientes dos sobrenadantes coletados de RAW 264.7, foram analisados por ELISA, método sanduíche. Para tanto, foram utilizados os *kits* comerciais (R & D Systems, Minneapolis, EUA), sendo catálogo DY401 para IL-1 β e catálogo DY410 para TNF- α , conforme orientação do fabricante.

Após diluição do anticorpo de captura anti-IL-1 β ou anti-TNF- α em PBS, foram adicionados 100 μ L/poço em microplacas para teste ELISA (Greiner-BioOne, Bélgica) e deixadas em temperatura ambiente, *overnight*, protegidas por filme plástico.

Posteriormente, os poços passaram por processo de lavagem que consistiu na remoção do sobrenadante e adição de 300 μ L de Tampão de Lavagem (PBS acrescido de 0,05% de *Tween* 20 [Sigma-Aldrich]), por três vezes consecutivas e secagem com batidas em papel toalha. Após, foram adicionados 300 μ L/poço de Tampão de Bloqueio (PBS acrescido de 0,1% de Soro Albumina Bovino – BSA [US Biological, Salem, EUA]). As placas foram deixadas em temperatura ambiente por uma hora.

Após procedimentos de lavagem, foram adicionados nas placas 100 μ L do padrão de citocinas (curva-padrão) e 100 μ L dos sobrenadantes celulares obtidos após exposição aos extratos.

Após duas horas de incubação em temperatura ambiente, os procedimentos de lavagem foram realizados e posteriormente foram acrescentados 100 μ L/poço de anticorpo de detecção (anti-IL-1 β ou anti-TNF- α) marcados com biotina. As placas foram mantidas em temperatura ambiente por duas horas. Novas lavagens foram feitas e após foram adicionados 100 μ L/poço de estreptavidina conjugada com enzima peroxidase. Sobre proteção da luz, as placas foram incubadas em temperatura ambiente por 20 minutos.

Após os procedimentos de lavagem, foram adicionados 100 μ L/poço da solução de substrato cromogênico, composto por Reagente A (peróxido de hidrogênio) e Reagente B (tetrametilbenzidina) na proporção de 1:1 (R & D Systems). As placas foram incubadas, abrigadas da luz, à temperatura ambiente por 20 minutos. Logo após, foram adicionados 50 μ L de ácido sulfúrico 2N (Solução de Parada) e as placas foram imediatamente levadas ao leitor de microplacas, e suas absorbâncias foram lidas em espectrofotômetro de microplacas (Bio-Tek) no comprimento de onda de 450 nm. Os dados obtidos foram convertidos em picogramas por mililitro (pg/mL), levando em consideração os valores da curva-padrão de IL-1 β ou TNF- α , com auxílio do programa GraphPad Prism 5.0.

3.5 Genotoxicidade

A verificação da frequência de micronúcleos (MN) foi utilizada para avaliar a genotoxicidade dos extratos sobre todas as linhagens. Para tanto, 2×10^4 células/mL de DMEM foram cultivadas em placas de 24 poços por 24 h. Em seguida, o sobrenadante foi descartado e adicionado os extratos de *R. officinalis* L. ou *T. vulgaris* L. diluídos em DMEM (25, 50, 100 mg/mL) ou DMEM sozinho (0 mg/mL), sendo $n = 2$ /grupo experimental. Após incubação de 24 h, o sobrenadante foi descartado e foram feitas lavagens com PBS para descarte de células não viáveis. Posteriormente, as células foram fixadas por 10 min com formaldeído 10%. Após nova lavagem, foram adicionados 200 μ L de PBS e uma gota de *fluoroshield with DAPI*. A placa foi levada para agitação em mesa orbital (Solab) por 5 min sob proteção da luz. Em seguida, com auxílio de microscópio de fluorescência (Axiovert 200, Zeiss, Jena, Alemanha) foi verificada a frequência de MN em 1000 células contadas, ambos corados em azul.

3.6 Análise estatística

Os dados obtidos foram apresentados em valores médios (\pm desvio-padrão) e analisados estatisticamente pelo GraphPad Prism 5.0 e Minitab 17. Foi considerada diferença estatística significativa quando $p \leq 0.05$. Os resultados da atividade antimicrobiana foram analisados por T-Test ou ANOVA complementado por Tukey Test e os dados de viabilidade celular, atividade anti-inflamatória e genotoxicidade foram analisados por ANOVA e Tukey Test.

4 ARTIGOS

4.1 Artigo – Antimicrobial effect on mono- and polymicrobial biofilms, cell viability, anti-inflammatory activity and genotoxic profile of *Rosmarinus officinalis* L. extract – *in vitro* analysis*

Biological effects of *Rosmarinus officinalis* L.

Jonatas Rafael de Oliveira^{1,#}, Daiane de Jesus¹, Leandro Wagner Figueira¹, Felipe Eduardo de Oliveira¹, Cristina Pacheco Soares², Samira Esteves Afonso Camargo¹, Antonio Olavo Cardoso Jorge¹, Luciane Dias de Oliveira¹

¹Department of Biosciences and Oral Diagnosis, Institute of Science and Technology, Univ Estadual Paulista/UNESP, São José dos Campos, SP, Brazil.

²Institute of Research and Development. Universidade do Vale do Paraíba/UNIVAP, São José dos Campos, SP, Brazil.

Corresponding author

E-mail: jroliveira16@hotmail.com

*Artigo elaborado de acordo com as normas do Periódico *Plos One* (ISSN 1932-6203).
Enviado para publicação em 01/04/2016.

Abstract

R. officinalis L. is a medicinal plant that has several biological activities and in this context we aimed to evaluate its antimicrobial effect on mono- and polymicrobial biofilms, its potential cytotoxic, its anti-inflammatory capacity and genotoxic profile. To this end, monomicrobial biofilms of *Candida albicans*, *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus faecalis*, *Streptococcus mutans* and *Pseudomonas aeruginosa* and polymicrobial biofilms composed by *C. albicans* with each bacterium were formed in the bottom of the wells of microtiter plates during 48 h and exposed for 5 min to *R. officinalis* L. glycolic extract (200 mg/mL). Its cytotoxic effect was examined on murine macrophages (RAW 264.7), human gingival fibroblasts (FMM-1), human breast carcinoma cells (MCF-7) and cervical carcinoma cells (HeLa) after exposure to different concentrations of the extract. Cell viability was analyzed by MTT, neutral red (NR) and crystal violet (CV) assays. Anti-inflammatory activity was evaluated on RAW 264.7 non-stimulated or stimulated by lipopolysaccharide (LPS) from *Escherichia coli* and treated with different concentrations of the extract for 24 h. Then, interleukin-1 beta (IL-1 β) and tumor necrosis factor alpha (TNF- α) were quantified by ELISA. Its genotoxicity was verified by the frequency of micronuclei (MN) at 1000 cells after exposure to concentrations of the extract for 24 h. Data were analyzed by T-Test or ANOVA and Tukey Test ($p \leq 0.05$). Thus, after exposure to the extract, significant reductions in colony forming units per milliliter (CFU/mL) and

reductions in their viability were observed in all studied biofilms. Regarding the cells, it was observed that concentrations ≤ 50 mg/mL provided cell viability above 50%. Immunomodulatory effect was observed, since the production of proinflammatory cytokines in the treated groups was similar or lower compared to the control group. There was also a lack of genotoxicity due to the frequency of MN in the groups exposed to extract was similar or less than the untreated group. Thus, it was shown that *R. officinalis* L. extract was effective on mono- and polymicrobial biofilms, it also provided cell viability above 50% (at ≤ 50 mg/mL), showed immunomodulatory effect, inhibiting the synthesis of proinflammatory cytokines and was not genotoxic.

Introduction

R. officinalis L. (Lamiaceae) is a perennial woody plant species, originated from the Mediterranean region, which currently can be found and cultivated in all continents as aromatic and ornamental plant, its leaves are commonly used as a condiment and also serving for medicinal purposes [1]. Its major constituents responsible for the pharmacological activities are 1,8-cineole (52.2%), camphor (15.2%) and α -pinene (12.4%) [2]. Some of their biologic activities have been reported as antimicrobial [3], antibacterial [4], antifungal [5,2], antimycobacterial [6], anti-inflammatory [7,8], antitumor [9], antioxidant [3,10,11], antimutagenic [12]

neuroprotective [13,14], cardioprotective [15], oxidative stress modulator [16,17] and DNA-protective [18].

Biofilms can be described as a micro ecosystem formed by different species of microorganisms, surrounded by a protein extracellular matrix and polysaccharides produced by them. This microbiome can be adhered both to an abiotic surface, such as dental materials, prostheses, implants, endotracheal tube, pacemakers and catheters, or a biotic surface, such as host tissues [19,20,21]. They are naturally found in interspecific associations in different niches. In these associations a microorganism may favor or hinder the development of other, interfere with antimicrobial susceptibility, as well as interfere with the expression of genes that may lead to generation of pathogenic forms [22,23].

C. albicans biofilm can be formed after contact with a suitable surface and its development will depend on favorable conditions. In the initial stage, the yeast forms adhered initiate the formation of germ tube and subsequently in the intermediate phase, there will be the elongation of these hyphae and production of extracellular matrix, composed by carbohydrates and proteins. Following, it occurs the formation of a mature biofilm, composed by a yeasts base where the hyphal forms follow adhered, involved by the matrix [24,25]. *S. aureus* is clinically relevant because it has high levels of systemic infections and mortality related to accumulation of its biofilm in medical devices [26]. It has been estimated that about 27% of candidemias in nosocomial infections occurred in

association with other microorganisms, being *S. aureus* the third most common [27]. According to Harriott and Noverr [20], *C. albicans* can contribute to the formation of *S. aureus* biofilm and thus, increase the resistance of the bacteria to the action of antibiotics.

A study conducted in the nematode *Caenorhabditis elegans*, which serves as host for multispecies infection of *C. albicans* and *E. faecalis*, it was observed that there was no death of *C. elegans* due to this microbial association. It was also observed inhibition of hyphae of *C. albicans* by *E. faecalis* action, which favored the survival of the nematode. Both microorganisms were commensal and non-pathogenic to *C. elegans*, but separately presented highly pathogenic effect [28].

In the oral cavity, *C. albicans* can form a complex microbial community with *Streptococcus* spp., especially *S. gordonii*, *S. sanguinis* and *S. mutans* [29,30] and may influence the pathogenesis of dental caries, particularly in pediatric patients [31, 32], which can be formed a virulent biofilm on the teeth surface of these patients, especially consisting of mutans group streptococci, particularly *S. mutans*, favored by poor hygienization and high intake of a diet rich in sucrose [33,34].

P. aeruginosa has the ability to form biofilm, since its cells can easily aggregate and synthesize extracellular matrix, composed of protein, nucleic acid and polysaccharides, factor that allows it to be tolerant to the action of antibiotics [35,36,37]. In the oral cavity, it may cause a more aggressive form of periodontitis just by their presence in supragingival

biofilm [38]. From the oral cavity, *P. aeruginosa* can be disseminated systemically and cause respiratory infection, particularly in hospitalized and immunosuppressed patients [39]. It has been found that in cases of patients with cystic fibrosis, it is common the co-infection of *P. aeruginosa* with other microorganisms, which is an impacting factor for the course of this disease and its treatment [40,41,37] and their association with *C. albicans* can seriously compromise the recovery of these patients, causing them pulmonary dysfunction [42].

The action of different types of *R. officinalis* L. extracts was reported on some tumor cell lines such as the ovarian cancer (SK-OV-3 and HO-8910), hepatocellular carcinoma (Bel-7402) [9], colorectal cancer (SW620 and DLD-1), pancreas cancer (MIA-PaCa-2 and PANC-1) [43], prostate cancer (LNCaP and 22Rv1) [44], colorectal adenocarcinoma (LoVo), hepatocarcinoma (HepG2). On the target lineages in this study, MCF-7 [45] and HeLa [46], it has also been reported the action of *R. officinalis* L, however in our study we used three different cell viability test and glycolic extract.

Studies have been undertaken in order to seek alternative ways to inhibit some inflammatory mechanisms that, for some reason, are biologically disarranged and tend to be harmful to the host. Thus, the anti-inflammatory effect of *R. officinalis* L. has been investigated regarding its ability to control the synthesis of proinflammatory cytokines, growth

factors, nitric oxide (NO) and prostaglandin [47], and check its effect on immune cells migration [8].

It was proposed that the ethanol extract of *R. officinalis* L. can promote protective effect against DNA damage [48]. According to these authors, human lymphocytes exposed to *R. officinalis* L. extract showed no genotoxicity, in the group treated with the extract and exposed to hydrogen peroxide (H₂O₂), it was noticed DNA-protective effect. This antimutagenic action of *R. officinalis* L. can be attributed to their biological composition. The phytochemical rosmarinic acid, present in Lamiaceae family species, including *R. officinalis* L., provided protective effect to the DNA of lung fibroblasts of Chinese hamster (V79), in the group which mutagenesis by chemotherapeutic doxorubicin was induced [49].

Based on these findings, the objectives of this study were to evaluate some biological activities of *R. officinalis* L. glycolic extract, such as antimicrobial activity against *C. albicans*, *S. aureus*, *E. faecalis*, *S. mutans* and *P. aeruginosa* in planktonic form and mono- and polymicrobial biofilms of *C. albicans* associated with *S. aureus*, *E. faecalis*, *S. mutans* and *P. aeruginosa*, cytotoxicity to RAW 264.7, FMM-1, MCF-7 and HeLa, anti-inflammatory activity in LPS-stimulated RAW 264.7 and genotoxic activity on the cell lines studied.

Materials and Methods

R. officinalis L. extract was commercially acquired (Mapric, SP, Brazil) at concentration of 200 mg/mL of propylene glycol. This extract was obtained from leaves of the plant.

Antimicrobial activity

Reference strains (ATCC - American Type Culture Collection) of *C. albicans* (ATCC 18804), *S. aureus* (ATCC 6538), *E. faecalis* (ATCC 4083), *S. mutans* (ATCC 35688) and *P. aeruginosa* (ATCC 15442) obtained from the Laboratory of Microbiology and Immunology, Institute of Science and Technology/UNESP, were used in this study. Strains were kept frozen (-80°C) in Brain Heart Infusion broth (BHI - Himedia, Mumbai, India) with 20% glycerol, for bacteria, and Yeast Extract Peptone Dextrose broth (YPD - Himedia) with 16% glycerol, for *C. albicans*.

Antimicrobial activity against planktonic cultures

Broth microdilution method

For the determination of minimum inhibitory (MIC) and minimum microbicidal (MMC) concentrations of the extract, microdilution broth method was used, according to the Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI), M7-A6 [50] and M27-A2 [51] supplemented by M27-S4 [52]. Firstly, bacteria were grown in BHI agar (Himedia) and *C. albicans* in

Sabouraud dextrose agar (SD - Himedia) for 24 h at 37°C with 5% CO₂ for *S. mutans*. Then, the microbial suspensions were prepared in sterile saline (0.9% NaCl). The turbidity of the suspensions was adjusted to 10⁶ CFU/mL (colony forming units per milliliter) in spectrophotometer (Micronal, São Paulo, Brazil). The culture medium used for bacteria growth was Mueller Hinton broth (Himedia) and for *C. albicans* was used RPMI 1640 broth (Himedia) with glutamine, without bicarbonate and phenol red indicator, buffered to pH 7,0±0,1 with MOPS [3- (N-morpholino) propanesulfonic acid] (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA). The extract microdilutions were performed in 96-well plates (TPP, Trasadingen, Switzerland), where 100 µL of culture medium were added in 10 wells and 100 µL of *R. officinalis* L. extract (200 mg/mL), only in the first well, where serial dilutions (1:2) started till the tenth dilution. Then, 100 µL of the standardized microbial suspension were added in all the wells. Thus, the inoculum concentrations were approximately 5 x 10⁵ CFU/mL for the bacteria, and 5 x 10² to 2.5 x 10³ CFU/mL for *C. albicans*. The concentrations of the extract were diluted from 50 to 0.09 mg/mL. Wells for growth control (C-, medium plus inoculum) and medium (C+, medium alone), were added. After 24 h incubation, MIC was determined at the last well of the microplate which was not observed turbidity. For determining MMC, 100 µL of MIC and its previous wells were seeded on BHI or SB agar. After 48 h of incubation it was determined the lowest concentration which showed no microbial growth.

Antimicrobial activity against mono- and polymicrobial biofilms

Biofilm formation in wells of 96-well plates

Microorganisms were first cultured on solid medium (BHI or SD agar) and then in liquid medium (BHI broth or Yeast Nitrogen Base - YNB, Himedia) for 24 h at 37°C (5% CO₂ for *S. mutans*). The generated microbial suspension was centrifuged at 2000 rpm/10 min (MPW-350, Warsaw, Poland), the supernatant discarded and the pellet suspended in saline. This procedure was repeated twice. Thereafter, the turbidity of the suspension was adjusted to 10⁷ CFU/mL, in spectrophotometer, and it was distributed in 96-well plates, 200 µL/well of this suspension. Plates were brought to incubation under agitation (37°C; 75 rpm - Quimis, Diadema, Brazil) for 90 min to initial adhesion of microorganisms. Then, the supernatant was discarded and added 200 µL of BHI or YNB broth. The plates were incubated for 48 h for the formation of biofilm, however, after 24 h, the culture medium was replaced by fresh medium.

The polymicrobial biofilms were formed in the same manner but equal parts of the standardized suspensions were added, i.e., 100 µL of each suspension and for growing in the wells, equal parts of BHI and YNB, 100 µL of each were also added.

Exposure of biofilms to the *R. officinalis* L. extract

After 48 h, biofilms were exposed to *R. officinalis* L. extract (200 mg/mL) (n = 10) for 5 min and saline was used as a negative control (n = 10). Cells affected by the extract were removed by washing with saline. Then, the biofilm has disaggregated by ultrasound homogenizer (Sonopuls HD 2200 – Bandelin Eletronic, Berlin, Germany) for 30 s and 25% power. The generated suspension was serially diluted (1:10) and 100 μ L were seeded into BHI or SD agar. In the case of polymicrobial biofilms, selective medium (agar) were used, such as SD with chloramphenicol (1%) for *C. albicans*, BHI with 75 mg NaCl/mL medium for *S. aureus*, *Mitis salivarius* with 20% sucrose and 0.2 international units (IU) of bacitracin/mL medium for *S. mutans*, m-Enterococcus (Difco) for *E. faecalis* and MacConkey (Difco) for *P. aeruginosa*. After 48 h incubation, CFU were counted and CFU/mL were calculated.

Cell viability

Cell lines

Human gingival fibroblasts (FMM-1), from the Faculty of Dentistry, University of São Paulo (USP, São Paulo, Brazil), murine macrophages (RAW 264.7), from Rio de Janeiro Cell Bank (APABCAM, Rio de Janeiro, Brazil), human breast carcinoma cells (MCF-7) and cervical carcinoma cells (HeLa), from Adolfo Lutz Institute (São Paulo, SP, Brazil), were used in this study. The cells were maintained in cell culture flasks (TPP) in

Dulbecco's modified Eagle medium (DMEM - LGC) with 10% fetal bovine serum (Invitrogen, New York, USA) and 1% penicillin-streptomycin (Gibco, Grand Island, NY, United States) under incubation (37°C and 5% CO₂) and atmospheric humidity. After subconfluency, RAW 264.7 was detached with cell scraper (TPP) and the other cell lines with trypsin (LGC). After centrifugation at 2000 rpm/5 min (Hermle - Z-300 - Labnet, Edison, USA), the supernatant of this cell suspension was discarded and the pellet was suspended in fresh medium. By exclusion test Trypan Blue (0.5%, Sigma-Aldrich), viable cells were quantified and, in 96-well plates, 200 µL/well of DMEM containing 4×10^4 cells were added.

Exposure to *R. officinalis* L. extract

R. officinalis L. extract was diluted in DMEM at concentrations of 25, 50 and 100 mg/mL and DMEM was used as negative control (0 mg/mL) with $n = 10$ /experimental group. After incubation for 24 h, each culture was exposed to the extract concentrations for 5 min. In order to discard cells that did not survive the treatment, washes with PBS were performed. Then, cell viability tests were applied (described hereafter).

MTT Assay

In this test, reductases present in viable cells, break MTT generating formazan, which may be quantified by spectrophotometer. Therefore, MTT solution [bromide of 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-

diphenyltetrazolium bromide] (Sigma Aldrich) was prepared at 0.5 mg/mL phosphate buffered saline (PBS - LGC Biotechnology, Cotia, Brazil), and 100 μ L of this solution were added per well. After incubation for 1 h under protection from light, the supernatant was discarded and 100 μ L of dimethyl sulfoxide (DMSO - Sigma Aldrich) was added in each well. New incubation of 10 min was performed, followed by agitation of the 96-well plate in shaker (Solab, Piracicaba, Brazil) for more 10 min. Then, the absorbance of the wells was measured by spectrophotometer (Bio-Tek, Vermont, USA) at 570 nm. Data generated were converted to cell viability reduction percentage.

Neutral red (NR) assay

This method analyzed the incorporation of NR into lysosomes of viable cells. To this end, NR powder (Vetec/Sigma-Aldrich, São Paulo, Brazil) was suspended in PBS (20 μ g/mL) and 100 μ L/well of this solution were added to the cells and after incubation for 2 h, protected from light, this solution was removed and to 100 μ L/well of pure ethyl alcohol were added. The plate was taken to agitation in shaker for 15 min. Then, the absorbance of the wells were analyzed in a microplate spectrophotometer ($\lambda = 570$ nm) and the values obtained were converted to percentage of cell viability.

Crystal violet (CV) assay

This method verified DNA staining of viable cells. First, cells were fixed for 10 min with 10% formaldehyde (Synth, São Paulo, Brazil) and then 100 μ L/well of CV solution (0.2 mg/mL) were added, after suspension of CV powder (Synth) in distilled water. After 15 min incubation, under protection from light, the dye was discarded and the wells were washed with distilled water until no presence of the dye was found. In each well, 100 μ L of pure ethyl alcohol were added and after 10 min of agitation in the shaker, absorbance was read on microplate spectrophotometer (λ = 570 nm). Obtained values were converted to percentage of cell viability.

Anti-inflammatory activity

Formation of experimental groups

RAW 264.7 was cultured in 24-well plates (TPP) at a concentration of 5×10^5 cells/mL of DMEM for 24 h. In the group non-lipopolysaccharide (LPS – Sigma-Aldrich) from *Escherichia coli*, the supernatant was discarded and *R. officinalis* L. extract diluted in DMEM at concentrations of 25, 50 and 100 mg/mL was added, DMEM was used as control (0 mg/mL), with $n = 10$ /experimental group. In the group with LPS, in these concentrations 1 μ g/mL LPS ($n = 10$ /group) was added. After exposure for 24 h, the supernatant was collected in microtubes and stored at -20°C for subsequent analysis of proinflammatory cytokines (IL-1 β and TNF- α).

Enzyme immunoassay (ELISA)

The levels of proinflammatory cytokines, IL-1 β and TNF- α , collected from RAW 264.7 supernatants were analyzed by ELISA sandwich method. Commercial kits were used (R&D Systems, Minneapolis, USA) and DY401 catalog for IL-1 β and DY410 catalog for TNF- α , according to manufacturer's guidance. The absorbance of the wells was assessed by microplate spectrophotometer ($\lambda = 450$ nm) and data were converted to picograms per milliliter (pg/mL), taking into account the standard curve values of IL-1 β or TNF- α , with GraphPad Prism 5.0 software.

Genotoxicity - Micronucleus (MN) assay

The test was applied separately in all cell lines. Firstly, 2×10^4 cells/mL of DMEM were cultured in 24-well plates for 24 h. Then, the supernatant was discarded and *R. officinalis* L. extract diluted in DMEM (25, 50, 100 mg/mL) or only DMEM (0 mg/mL) were added, with $n = 2$ /experimental group. After incubation for 24 h, supernatant was discarded and washing with PBS was done to discard the non-viable cells. Subsequently, the cells were fixed for 10 min with 10% formaldehyde. After new washing, 200 μ L of PBS and one drop of fluorshield with DAPI (Sigma-Aldrich) were added. The plate was taken to agitation for 5 min, protected from light. Then, with the aid of fluorescence microscope (Axiovert 200 - Zeiss, Jena, Germany) MN frequency was observed in 1000 cells counted, both stained blue.

Statistical analysis

The results, analyzed by the GraphPad Prism 5.0 and Minitab 17, were presented as mean values (\pm standard deviation). It was considered statistically significant when $p \leq 0.05$. The results of the antimicrobial activity were analyzed by T-Test or ANOVA and Tukey Test. Data of cell viability, anti-inflammatory activity and genotoxicity were analyzed by ANOVA and Tukey Test.

Results

Antimicrobial activity

***R. officinalis* L. extract showed microbiostatic and microbicidal effects on planktonic forms.** Planktonic forms of *C. albicans*, *S. aureus*, *E. faecalis*, *S. mutans* and *P. aeruginosa* had growth inhibition at concentrations ≤ 50 mg/mL. However, *C. albicans* (3.13 mg/mL) and *P. aeruginosa* (6.25 mg/mL) showed elimination, other microorganisms showed MMC >50 mg/mL (Table 1).

Table 1. Antimicrobial effect of *R. officinalis* L. extract on planktonic forms. Values (mg/mL) of minimal inhibitory concentration (MIC) and minimal microbicidal concentration (MMC) of *R. officinalis* L. extract (200 mg/mL), verified after 24 h of exposure.

Microorganism	mg/mL	
	MIC	MMC
<i>C. albicans</i>	0.78	3.13
<i>S. aureus</i>	25	>50
<i>E. faecalis</i>	50	>50
<i>S. mutans</i>	25	>50
<i>P. aeruginosa</i>	6.25	6.25

Monomicrobial biofilms were affected by *R. officinalis* L. extract. There was significant decrease of CFU/mL in monomicrobial biofilms of *C. albicans*, *S. aureus*, *E. faecalis*, *S. mutans* and *P. aeruginosa* after treatment with *R. officinalis* L. extract (200 mg/mL) for 5 min (Fig 1). Thus, significant reductions were observed in these biofilms after exposure to the extract (Fig 2), most notably in *C. albicans* and *P. aeruginosa*, which showed complete elimination of biofilm.

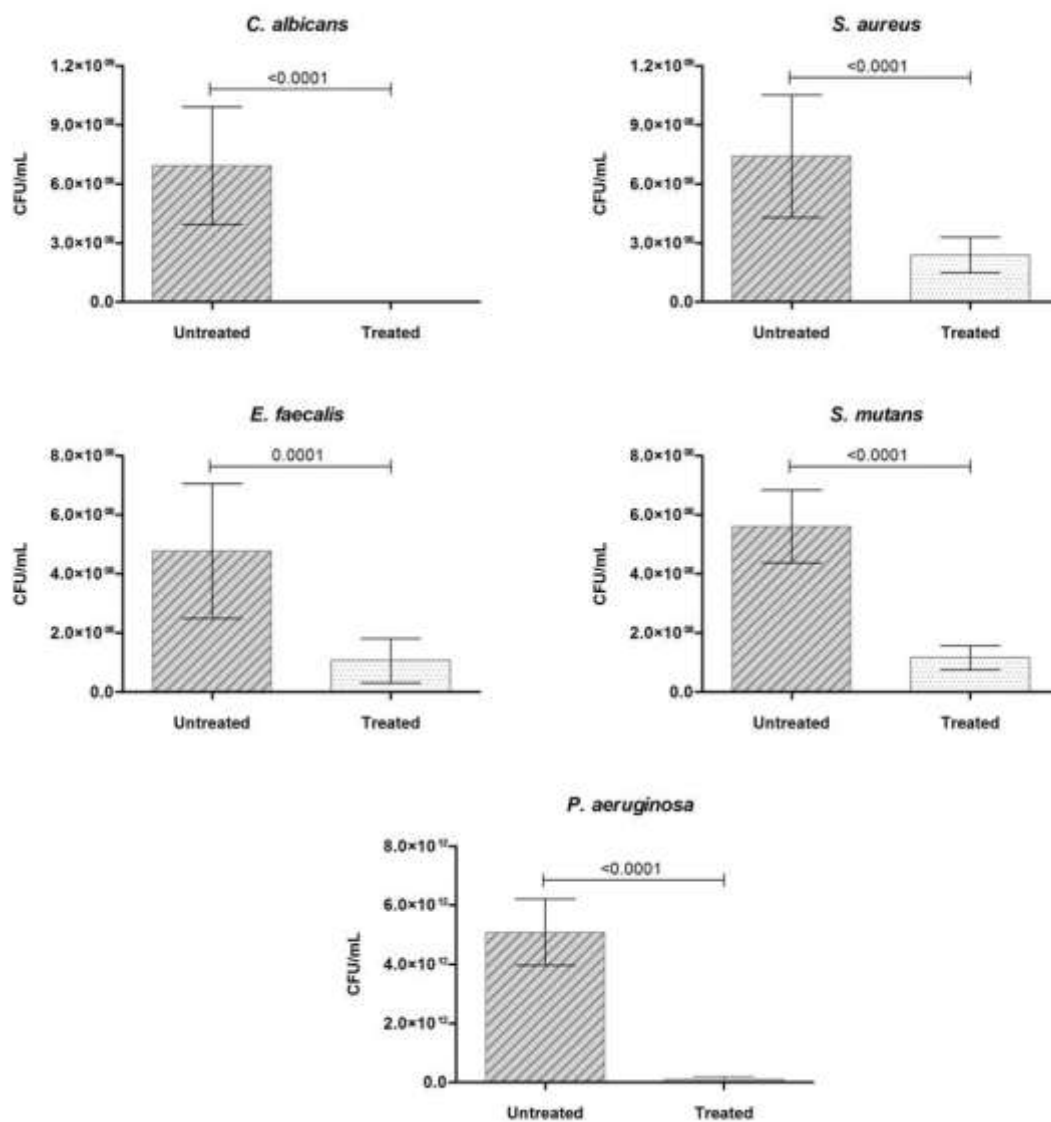


Fig 1. Action of *R. officinalis* L. extract on monomicrobial biofilms. Mean values (\pm standard deviation) of CFU/mL of *C. albicans*, *S. aureus*, *E. faecalis*, *S. mutans* and *P. aeruginosa* biofilms presented in untreated group (0.9% NaCl) and treated group with *R. officinalis* L. extract (200 mg/mL) for 5 min. p values follow on the columns ($n = 10$. T-Test, $p \leq 0.05$).

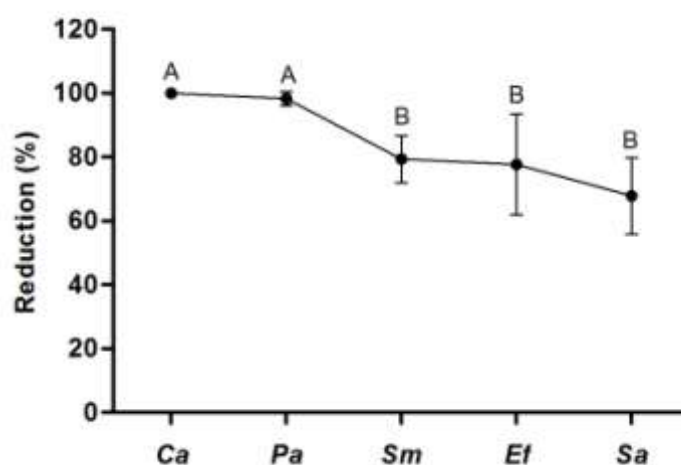


Fig 2. Reduction percentage of monomicrobial biofilms. After exposure to *R. officinalis* L. extract (200 mg/mL) for 5 min, significant reductions were observed in the biofilms of *C. albicans* (Ca), *S. aureus* (Sa), *E. faecalis* (Ef), *S. mutans* (Sm) and *P. aeruginosa* (Pa). The groups were reunited according to their homogeneity. Statistically significant differences can be observed among groups with different superscript letters. (n = 10. ANOVA, Tukey test, $p \leq 0.05$).

Polymicrobial biofilms were susceptible to *R. officinalis* L. extract. As in monomicrobial biofilms, it was also observed antibiofilm effect of *R. officinalis* L. extract in polymicrobial associations between *C. albicans* and each bacterium, i.e., *S. aureus*, *E. faecalis*, *S. mutans* and *P. aeruginosa* (Fig 3). Although a similar amount of CFU/mL for each microorganism was used for biofilm formation, after 48 h of incubation, a significant difference was observed between CFU/mL amount of *C. albicans* and each bacterium, being greater the amount of bacteria in all the associations. However, the application of *R. officinalis* L. extract (200 mg/mL) for 5 min resulted in a significant decrease in CFU/mL number in all treated groups, taking into consideration the untreated group.

Additionally, in Fig 4, it was observed that the rate of reduction of both, yeast and bacteria, in polymicrobial biofilm was similar in the associations of *C. albicans* and *E. faecalis* and *C. albicans* and *P. aeruginosa*. In biofilms composed by *C. albicans* and *S. aureus* and *C. albicans* and *S. mutans*, there was a greater reduction in yeast when compared to the bacterium (Fig 4).

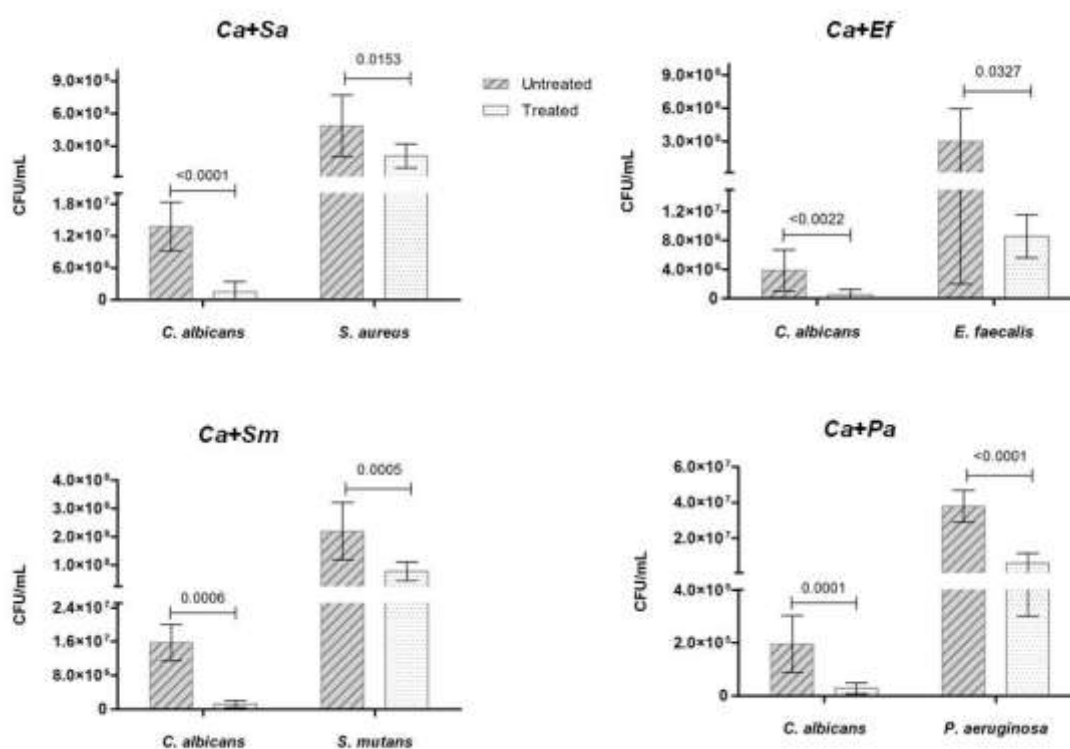


Fig 3. Action of *R. officinalis* L. extract on polymicrobial biofilms. Mean (\pm standard deviation) of CFU/mL of polymicrobial associations of *C. albicans* with *S. aureus* (Ca+Sa), *E. faecalis* (Ca+Ef), *S. mutans* (Ca+Sm) and *P. aeruginosa* (Ca+Pa) presented in the untreated group (0.9% NaCl) and treated groups with *R. officinalis* L. extract (200 mg/mL) for 5 min. *p* values follow on the columns (n = 10. T-Test, *p* \leq 0.05).

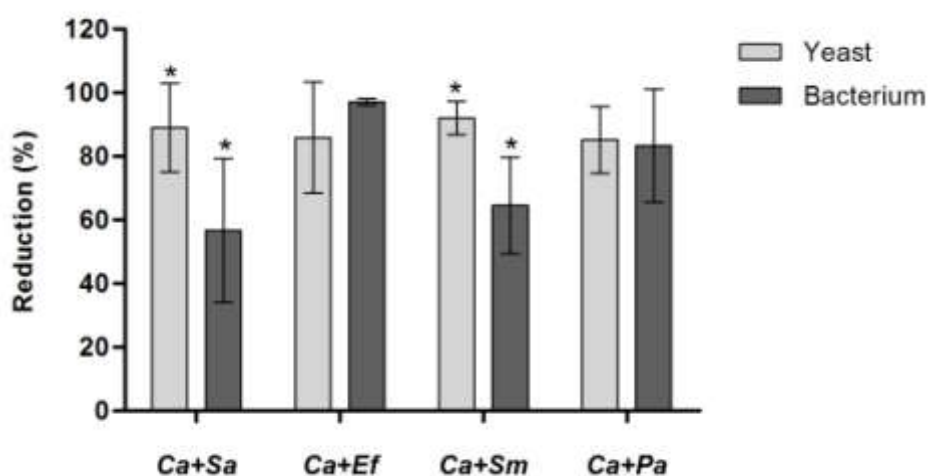


Fig 4. Reduction percentage of polymicrobial biofilms. Data obtained in polymicrobial associations of *C. albicans* with *S. aureus* (Ca+Sa), *E. faecalis* (Ca+Ef), *S. mutans* (Ca+Sm) and *P. aeruginosa* (Ca+Pa) after exposure to *R. officinalis* L. extract (200 mg/mL) for 5 min. Statistically significant difference between the reductions in yeast and bacteria in each association can be observed among groups with superscript asterisks. (n = 10. T-Test, $p \leq 0.05$).

Cell viability

The viability of RAW 264.7, FMM-1, MCF-7 and HeLa decreased according to the concentration of the *R. officinalis* L. extract. Three cell viability tests were used, as follows: MTT, that verified the enzymatic activity of viable cells capable of degrading MTT salt to formazan with the aid of specific enzymes; neutral red (NR), which analyzed the lysosomal activity of viable cells after the incorporation of this dye; and crystal violet (CV), capable of staining cells DNA that survived the treatment and remained attached to the wells. In Fig 5, it can be seen the cell viability percentage in cultures exposed to concentrations of the extract analyzed by MTT test (Fig 5A), NR (Fig 5B) and CV (Fig 5C). Significant reductions

were observed in the viability of RAW 264.7 at concentrations of 100 (MTT, NR and CV), 50 (MTT, NR and CV) and 25 mg/mL (CV). FMM-1 also showed a decrease of viability at 100 (MTT, NR and CV), 50 (MTT and CV) and 25 mg/mL (MTT). For MCF-7, a significant reduction of viability was found at 100 (MTT, RN and CV) and 50 mg/mL (MTT and NR) and the viability of HeLa cells was reduced by exposure at 100 (MTT, RN and RC) and 50 mg/mL (NR and CV).

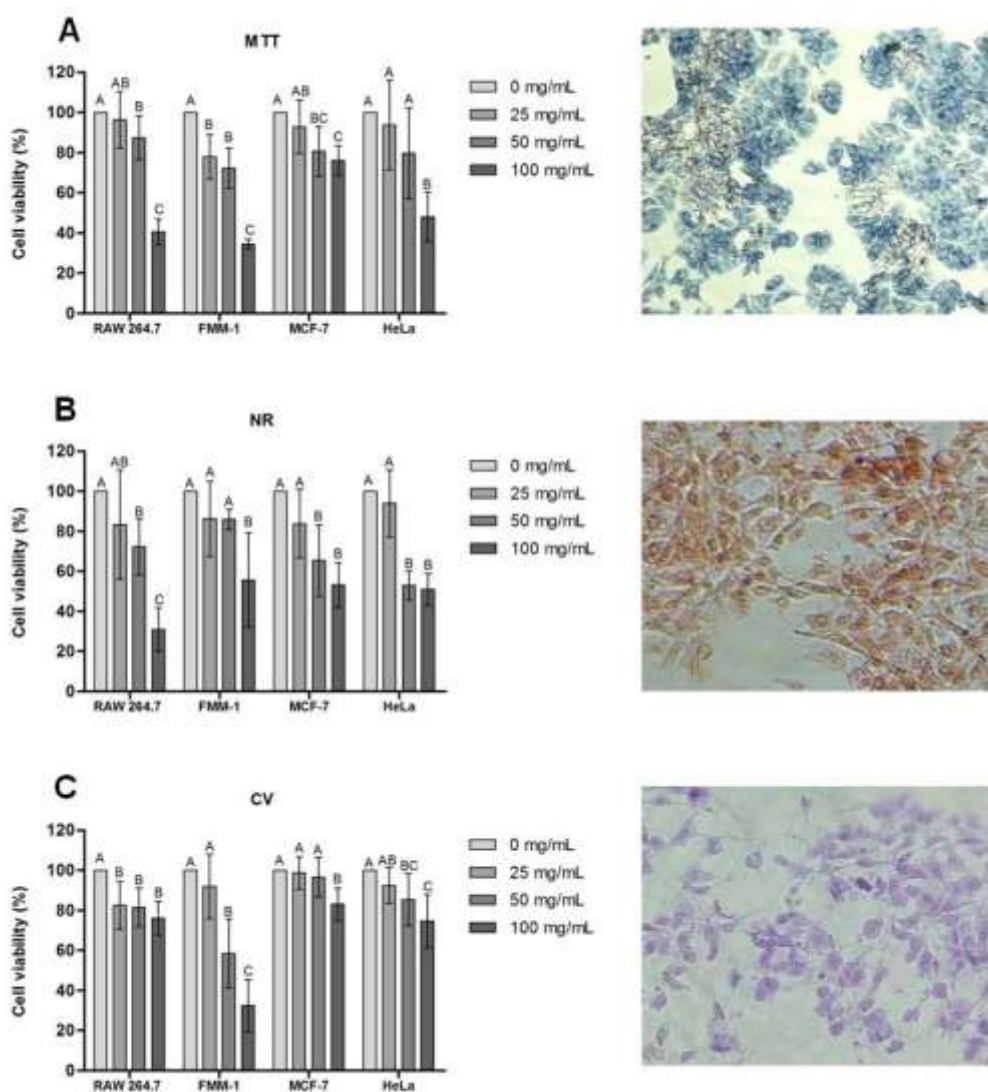


Fig 5. Cell viability verified by MTT, NR and CV assays. After exposure of RAW 264.7, FMM-1, MCF-7 and HeLa at concentrations of 25, 50 and 100 mg/mL of *R. officinalis* L. extract, cell viability of the cultures, compared to the control group (0 mg/mL), were analyzed by: (A) reduction of MTT salt to formazan; (B) Incorporation of neutral red (NR) in the lysosomes; and (C) DNA staining with crystal violet (CV). Statistically significant differences among experimental groups can be observed with different superscript letters ($n = 10$. ANOVA, Tukey Test, $p \leq 0.05$). Optical microscopy (200X).

In Fig 6, the cell viability percentage of the lineages in each of the concentrations tested can be verified. For MTT assay (Fig 6A), it was found that cell viability percentage of the four lineages was similar after exposure to 25 and 50 mg/mL, however, at 100 mg/mL, FMM-1 showed lower cell viability percentage than MCF-7 and HeLa. In the NR assay (Fig 6B), it was noted statistical similarity in the percentage of cell viability of all cell lineages exposed to 25 mg/mL. At 50 mg/mL, it was noted that the MCF-7 and HeLa had lower cell viability rate than FMM-1, and after treatment with 100 mg/mL, it was found lower cell viability rate in the culture of RAW 264.7, compared to the other lineages, which showed similar cell viability percentage. By CV assay (Fig 6C) was demonstrated homogeneity among cell lineages at a concentration of 25 mg/mL. After exposure to 50 mg/mL, it was noted lower percentage of cell viability in the FMM-1, compared to other cells. In the same way, the concentration of 100 mg/mL showed lower percentage of cell viability for FMM-1 when compared to the other studied lineages.

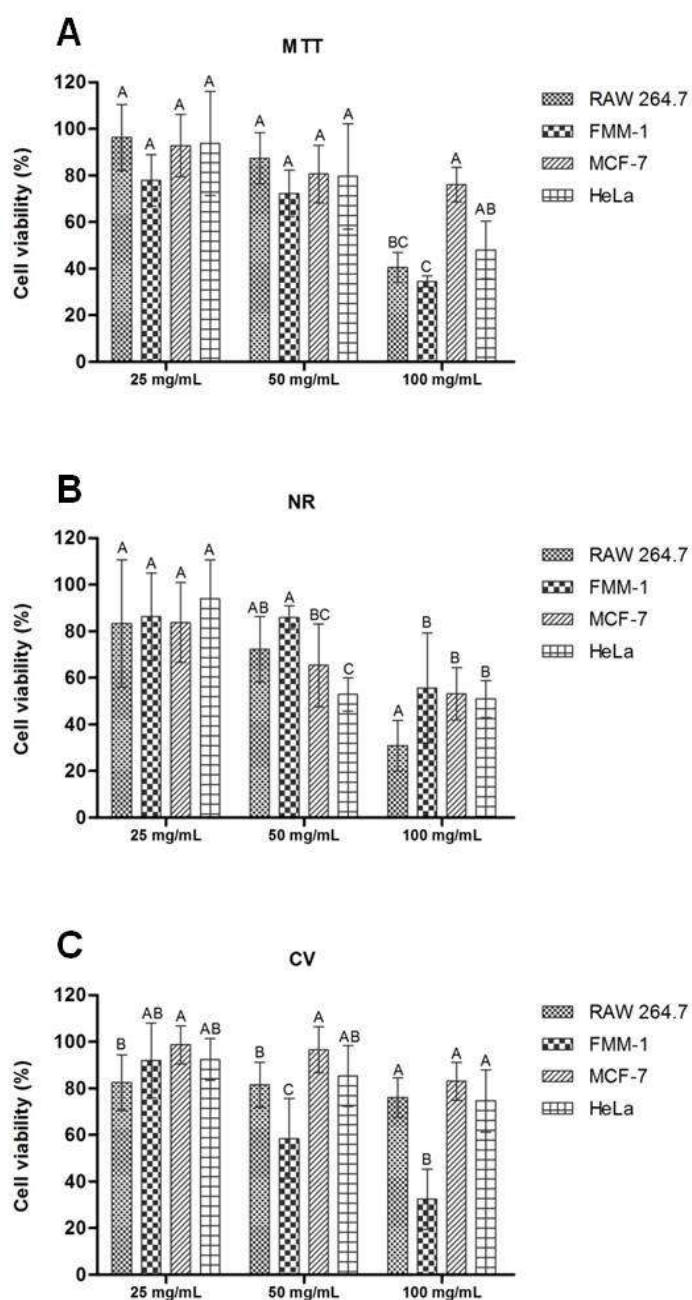


Fig 6. Cell viability percentage obtained in each concentration of the *R. officinalis* L. Data were obtained in RAW 264.7, FMM-1, MCF-7 and HeLa cultures, after exposure for 5 min to concentrations of *R. officinalis* L. extract (25, 50 e 100 mg/mL), and analyzed by MTT (A), NR (B) and CV (C) assays. Different superscript letters indicate statistically significant differences among experimental groups. (n = 10. ANOVA, Tukey Test, $p \leq 0.05$).

Anti-inflammatory activity

Proinflammatory cytokines (IL-1 β and TNF- α) synthesis was suppressed in LPS-stimulated RAW 264.7 macrophages culture after application of *R. officinalis* L. extract. In presence of LPS, it was found that the concentrations of *R. officinalis* L. extract afforded significant inhibition of cytokines production (Table 2). Likewise, in the quantification of TNF- α levels was observed both, in the absence or presence of LPS, there was significant inhibition of this cytokine production with the application of the plant extract concentrations.

Table 2. Production of proinflammatory cytokines IL-1 β and TNF- α by RAW 264.7, in the presence or absence of LPS. Mean values (\pm standard deviation) of IL-1 β and TNF- α (pg/mL) production by RAW 264.7 after contact with concentrations of 25, 50 or 100 mg/mL of *R. officinalis* L. extract for 24 h in the absence or presence of LPS (1 μ g/mL). Statistically significant differences among experimental groups can be observed with different superscript letters. (n = 10. ANOVA, Tukey Test, $p \leq 0.05$).

Group (mg/mL)	Cytokine (pg/mL)			
	IL-1 β		TNF- α	
	no LPS	LPS	no LPS	LPS
0	2.7 \pm 5.79 ^A	20.02 \pm 11.17 ^A	19.74 \pm 10.99 ^A	8125.46 \pm 7305.34 ^A
25	0.91 \pm 1.86 ^A	1.02 \pm 2.24 ^B	3.65 \pm 3.28 ^B	28.60 \pm 34.66 ^B
50	1.44 \pm 1.99 ^A	1.72 \pm 3.63 ^B	3.87 \pm 2.66 ^B	16.55 \pm 8.86 ^B
100	0.27 \pm 0.85 ^A	0 ^B	2.38 \pm 2.51 ^B	4.77 \pm 4.2 ^B

Genotoxicity

MN frequency was similar or lower than the control group after treatment. Several materials can cause damage to DNA, represented by the presence of small structures close to the cell nucleus called

micronuclei (Fig 7). It was found that the frequency of MN was similar among treated and control (0 mg/mL) groups for RAW 264.7 and HeLa (Fig 8A). For FMM-1 and MCF-7, the concentrations of the extract afforded protection against DNA damage, since the presence of MN was lower than the control group. Additionally, the MN frequency formed by cell after exposure to each concentration (0, 25, 50 and 100 mg/mL) can be analyzed in Fig 8B. At control group (0 mg/mL) can be found that the formation of MN was higher in FMM-1 than in MCF-7 and HeLa. After exposure to 25 mg/mL, RAW 264.7 showed more MN than the other lineages. Concentrations of 50 and 100 mg/mL do not provide MN formation in MCF-7 and HeLa.

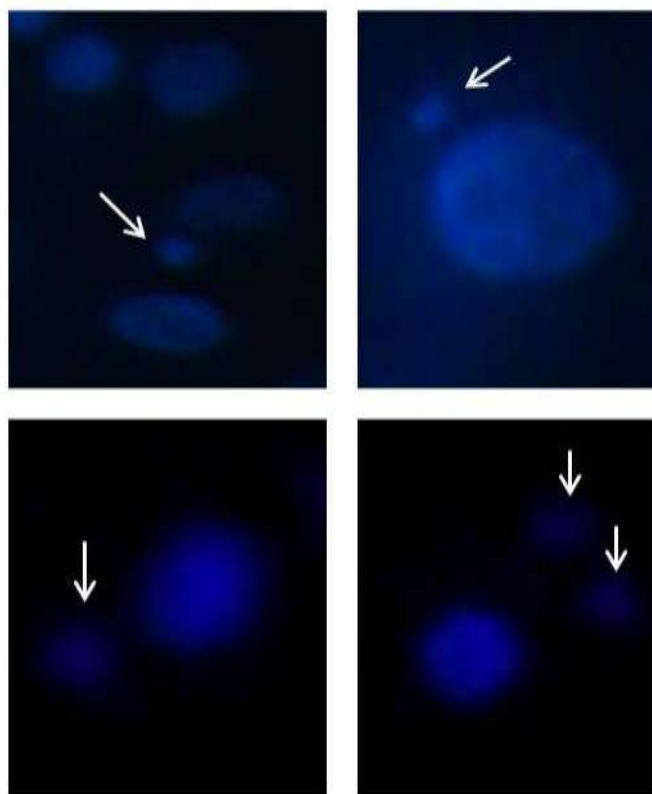


Fig 7. Micronuclei (MN). MN are DNA fragments located around and close to the cell nucleus (indicated by white arrows), and may have variable size but always smaller than the cell nucleus and varied amount, as shown in the figure bottom right, which shows two MN. Its presence characterizes DNA damage, provided by intrinsic or extrinsic causes. After fixing the cells, previously treated or not with different concentrations of *R. officinalis* L. extract, DAPI dye was added and the nuclei and MN were observed through fluorescence microscopy (200X) and then the frequency of MN was determined after counting 1000 nuclei.

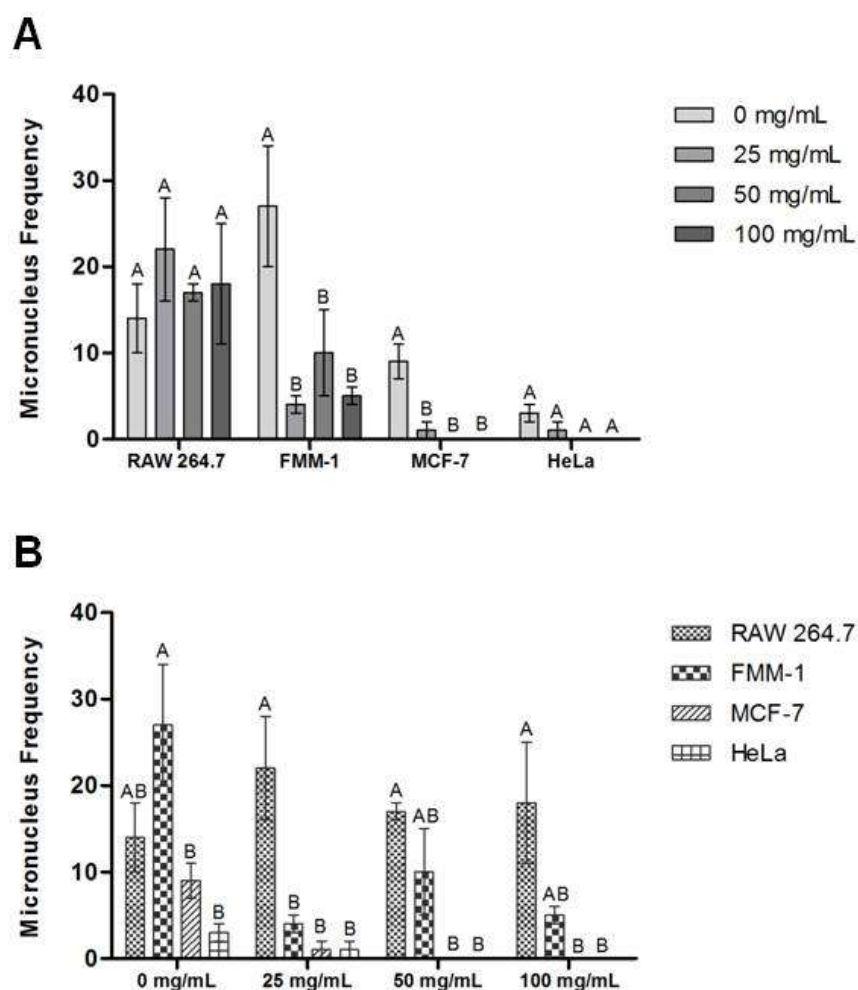


Fig 8. Micronuclei (MN) frequency presented by cells. RAW 264.7, FMM-1, MCF-7 and HeLa were exposed to concentrations of 25, 50 and 100 mg/mL of *R. officinalis* L. extract. After 24 h, MN frequency was counted. (A) MN frequency presented by the four cell lineages per 1000 cells counted. (B) MN frequency obtained in each experimental group (0, 25, 50 and 100 mg/mL). Statistically significant difference among treated groups and control groups can be observed with different superscript letters ($n = 2$. ANOVA, Tukey Test, $p \leq 0.05$).

Discussion

R. officinalis L. extract demonstrated effective antimicrobial action in this study. It was able to inhibit the growth of *C. albicans*, *S. aureus*, *E. faecalis*, *S. mutans* and *P. aeruginosa* in planktonic forms (Table 1) and, in addition to this, significantly affected mono- (Fig 1) and polymicrobial biofilms (Fig 3), formed by association of *C. albicans* with *S. aureus*, *E. faecalis*, *S. mutans* and *P. aeruginosa*.

According to the results obtained in planktonic assay, the concentration of 200 mg/mL of biofilms was applied, since controlling these communities require higher concentrations of antimicrobial agents in order to significantly affect their structures [53]. Thus, after exposure to the extract, significant reductions were observed in monomicrobial biofilms of *C. albicans* ($99.96 \pm 0.07\%$), *S. aureus* ($67.84 \pm 12.05\%$), *E. faecalis* ($77.64 \pm 15.67\%$), *S. mutans* ($79.32 \pm 7.34\%$), and *P. aeruginosa* ($98.23 \pm 2.17\%$) (Fig 2). Although they were all affected by the extract, *C. albicans* and *P. aeruginosa* biofilms showed the highest reduction percentage.

Regarding polymicrobial biofilms, it was observed that there were significant reductions in both, yeast and bacteria, after treatment with the extract (Fig. 4). However, the reduction percentages showed by each microorganism varied after this exhibition. In association *C. albicans* with *S. aureus* (*Ca+Sa*), it was found that the yeast ($89 \pm 13.89\%$) showed the higher reduction percentage than the bacterium ($56.75 \pm 22.58\%$). It was reported that the development of *C. albicans* can be harmed by *S. aureus*,

since this bacteria can easily adhere to *C. albicans* hyphae, forming a base composed by hyphae in which staphylococci adhere [20]. Likewise, reduction of *C. albicans* ($92.04 \pm 5.24\%$) was greater than *S. mutans* ($64.55 \pm 15.12\%$) in the association *Ca+Sm*. According to Pereira-Cenci et al. [54], this yeast favors the development of *S. mutans* biofilm. In polymicrobial biofilms, the different species may compete and this could harm or favor the development of each other [22,23].

In association of *C. albicans* ($85.87 \pm 17.48\%$) with *E. faecalis* ($97.11 \pm 1\%$) there was no significant difference between the reductions presented by the yeast and the bacterium. Cruz et al., [28] noted that *C. albicans* associated with *E. faecalis*, during an *in vivo* infection (*C. elegans*), prevented bacterium cell death and the bacterium, consequently, inhibited the formation of *C. albicans* hyphae, which resulted in the survival of the host. Thus, the authors noted that these microorganisms were commensal for *C. elegans* and, out polymicrobial association, they were considered pathogenic to the host. The biofilm composed by *C. albicans* ($85.19 \pm 10.48\%$) and *P. aeruginosa* ($83.33 \pm 17.79\%$) also showed no significant difference between the reductions showed by the microorganisms. Morales et al. [55] attributed to phenazine, an enzyme produced by *P. aeruginosa*, the regulation of the of fungal cells growth in polymicrobial biofilm, as well as the control of hyphal formation of *C. albicans*. Thus, it was noticed some balance between species in the

biofilm formed by *C. albicans* and *E. faecalis* (*Ca+Ef*) and *C. albicans* and *P. aeruginosa* (*Ca+Pa*).

By assessing the viability of biofilms, it was also found the antimicrobial action of *R. officinalis* L. extract, being observed certain homogeneity among the reduction percentages presented by biofilms ranging from 36.48 ± 10.44 and $65.92 \pm 9.82\%$ (Fig 5). This method has been used to verify the performance of a therapeutic agent against biofilms and how it can be affected. This is done by metabolic activity analysis of biofilms, where only viable cells are capable of metabolizing MTT salt to formazan by the action of reductases present in these cells [56].

Cell viability assays in RAW 264.7, FMM-1, MCF-7 and HeLa showed that the concentration of 100 mg/mL resulted in a significant decrease in cell viability in most groups, previously confirmed by the three tests. In some cases, cell viability reached levels lower than 50%, such as RAW 264.7, FMM-1 and HeLa cells, assessed by MTT assay (Fig. 6A), in all lineages analyzed by NR assay (Fig. 6B) and FMM-1, as verified by CV assay (Fig. 4C). In many cases, the concentration of 25 mg/mL provided cell viability similar to the control group, verified on RAW 264.7, MCF-7 and HeLa cells, by MTT assay, on all lines, by NR assay, and on FMM-1, MCF 7 and HeLa, by CV assay. The concentration of 50 mg/mL, showed some peculiarities, such as: i. lower cell viability than the control group, but with percentages of viability higher the concentration of 100 mg/mL, as

shown on RAW 264.7 and FMM-1 (MTT), RAW 264.7 (NR) and FMM-1 (CV); ii. lower viability than the control, but similar to the concentration of 100 mg/mL, as seen in MCF-7 (MTT), MCF-7 and HeLa (NR) and HeLa cells (CV); iii. show similarity compared to the control and 25 mg/mL, as observed in HeLa (MTT), FMM-1 (NR) and MCF-7 (CV); and presenting similarity between the concentrations of 25 and 100 mg/mL and the control, as noted in RAW 264.7 (CV). Thus, it can be suggested that some concentrations could interfere with cellular metabolism, harming its enzymatic action, and also affect the lysosomal activity. In this case, it may contribute to the interference of particles entrance and exit of the cell, damaging many of its functions [57]. However, generally, they could promote inhibition of DNA damage, it was found that cell viability of RAW 264.7, MCF-7 and HeLa cells were above 50% after application of all concentrations, by CV assay. The extract may provide protective effects on DNA, especially on MCF-7 and HeLa. Thus, it can be noted that the cellular targets of therapeutic agents must be carefully studied, since certain cell structures may be more or less affected, interfering with its control and viability.

Regarding anti-inflammatory activity of *R. officinalis* L., it was noted that all concentrations analyzed demonstrated immunomodulatory effect (Table 2). The production of IL-1 β and TNF- α in the treated groups (100, 50, 25 mg/mL) was lower than in control group (0 mg/mL), demonstrating that the extract can inhibit the natural synthesis of these pro-inflammatory

cytokines. In addition, in the groups stimulated with LPS, it was found that all concentrations also promoted immunomodulatory effect on the production of these cytokines, since there were significant reductions in their synthesis with the extract. Similarly, in the study of Yu et al. [47] it was also demonstrated anti-inflammatory effect of *R. officinalis* L. These authors proved that the extract of this plant, which was analyzed on LPS-stimulated RAW 264.7, was able to reduce the levels of nitric oxide synthase enzyme (NOS), responsible by NO synthesis, as well as inhibiting TNF- α production. Besides, it was noted that the aqueous extract of *R. officinalis* L., promoted in Wistar rats, orally treated with this extract, reduction of neutrophils migration and decreased levels of inflammatory mediators in exudates, caused by the inflammatory agent carrageenan [8].

In the genotoxicity test, where the MN frequency was verified, it was found that all tested concentrations did not stimulate DNA damage, i.e., they were DNA-protective, since the MN frequency was statistically similar to the control group for RAW 264.7 and significantly lower in the case of the other cells (Fig. 9). The concentrations of 50 and 100 mg/mL completely inhibited the production of MN in HeLa and MCF-7. With this, it was evident that *R. officinalis* L. extract showed no mutagenic effect for the studied cells. This DNA-protective effect was also demonstrated on human lymphocytes exposed to H₂O₂ and treated with *R. officinalis* L. extract. The plant extract, besides did not stimulate DNA damage, also protected it from the action of hydrogen peroxide [48]. Furthermore, it was

proved that one of its phytochemicals, rosmarinic acid, showed no mutagenic effect and was able to protect fibroblasts V79 DNA from doxorubicin action [49].

Increasingly, the number of medical and dental products based on medicinal plants has increased, because it has been proven their effectiveness in various application areas, as was evidenced in our study that showed control of mono- and polymicrobial biofilm, effect immunomodulatory and antimutagenic action of *R. officinalis* L. extract. Based on biological potential, this medicinal plant has great chances to be a promising therapeutic agent applied in some formulations as toothpastes, mouthwashes, irrigating root canals, ointments, soaps, among others.

In this study, *R. officinalis* L. extract demonstrated effective biological activities. It acted on monomicrobial biofilms of *C. albicans* (Ca), *S. aureus* (Sa), *E. faecalis* (Ef), *S. mutans* (Sm) and *P. aeruginosa* (Pa) as well as on polymicrobial biofilms (Ca+Sa, Ca+Ef, Ca+Sm and Ca+Pa), with significant reductions in CFU/mL and viability. Regarding cell lines, the extract promoted cell viability above 50% (at ≤ 50 mg/mL). It showed significant immunomodulatory effect, controlling the synthesis of pro-inflammatory cytokines such as IL-1 β and TNF- α in LPS-stimulated RAW 264.7 or not. In addition, exhibited DNA-protective effect in all tested cells.

References

- [1] Rašković A, Milanović I, Pavlović N, Čebović T, Vukmirović S, Mikov M. Antioxidant activity of rosemary (*Rosmarinus officinalis* L.) essential oil and its hepatoprotective potential. BMC Complement Altern Med. 2014; 14:225. doi: 10.1186/1472-6882-14-225. PMID: 25002023.
- [2] da Silva BN, Nakassugi LP, Faggion POJ, Kohiyama CY, Mossini SA, Grespan R, et al. Antifungal activity and inhibition of fumonisin production by *Rosmarinus officinalis* L. essential oil in *Fusarium verticillioides* (Sacc.) Nirenberg. Food Chem. 2015; 166:330-336. doi: 10.1016/j.foodchem.2014.06.019. PMID: 25053064.
- [3] Guerra-Boone L, Alvarez-Román R, Alvarez-Román R, Salazar-Aranda R, Torres-Cirio A, Rivas-Galindo VM, et al. Antimicrobial and antioxidant activities and chemical characterization of essential oils of *Thymus vulgaris*, *Rosmarinus officinalis* and *Origanum majorana* from northeastern México. Pak J Pharm Sci. 2015; 28:363-369. PMID: 25631514.
- [4] Irshaid FI, Tarawneh KA, Jacob JH, Alshdefat AM. Phenol content, antioxidant capacity and antibacterial activity of methanolic extracts derived from four Jordanian medicinal plants. Pak J Biol Sci. 2014; 17:372-379. PMID: 24897791.

- [5] Gauch LM, Silveira-Gomes F, Esteves RA, Pedrosa SS, Gurgel ES, Arruda AC, et al. Effects of *Rosmarinus officinalis* essential oil on germ tube formation by *Candida albicans* isolated from denture wearers. *Rev Soc Bras Med Trop*. 2014; 47:389-391. PMID: 25075493.
- [6] Abuzeid N, Kalsum S, Koshy RJ, Larsson M, Glader M, Andersson H, et al. Antimycobacterial activity of selected medicinal plants traditionally used in Sudan to treat infectious diseases. *J Ethnopharmacol*. 2014; 157:134-139. doi: 10.1016/j.jep.2014.09.020. PMID: 25261689.
- [7] Rocha J, Eduardo-Figueira M, Barateiro A, Fernandes A, Brites D, Bronze R, et al. Anti-inflammatory effect of rosmarinic acid and an extract of *Rosmarinus officinalis* in rat models of local and systemic inflammation. *Basic Clin Pharmacol Toxicol*. 2015; 116:398-413. doi: 10.1111/bcpt.12335. PMID: 25287116.
- [8] Silva AM, Machado ID, Santin JR, de Melo IL, Pedrosa GV, Genovese MI, et al. Aqueous extract of *Rosmarinus officinalis* L. inhibits neutrophil influx and cytokine secretion. *Phytother Res*. 2015; 29:125-133. doi: 10.1002/ptr.5238. PMID: 25319517.
- [9] Wang W, Li N, Luo M, Zu Y, Efferth T. Antibacterial activity and anticancer activity of *Rosmarinus officinalis* L. essential oil compared to that of its main components. *Molecules*. 2012; 17:2704-2713. doi: 10.3390/molecules17032704. PMID: 22391603.

- [10] Motlagh MK, Sharafi M, Zhandi M, Mohammadi-Sangcheshmeh A, Shakeri M, Soleimani M, et al. Antioxidant effect of rosemary (*Rosmarinus officinalis* L.) extract in soybean lecithin-based semen extender following freeze-thawing process of ram sperm. *Cryobiology*. 2014; 69:217-222. doi: 10.1016/j.cryobiol.2014.07.007. PMID: 25050864.
- [11] Dias LS, Menis ME, Jorge N. Effect of rosemary (*Rosmarinus officinalis*) extracts on the oxidative stability and sensory acceptability of soybean oil. *J Sci Food Agric*. 2015; 95:2021-2027. doi: 10.1002/jsfa.6914. PMID: 25214375
- [12] Felicidade I, Lima JD, Pesarini JR, Monreal AC, Mantovani MS, Ribeiro LR, et al. Mutagenic and antimutagenic effects of aqueous extract of rosemary (*Rosmarinus officinalis* L.) on meristematic cells of *Allium cepa*. *Genet Mol Res*. 2014; 13:9986-9996. doi: 10.4238/2014.November.28.3. PMID: 25501210.
- [13] Lin CY, Chen JH, Fu RH, Tsai CW. Induction of Pi form of glutathione S-transferase by carnosic acid is mediated through PI3K/Akt/NF- κ B pathway and protects against neurotoxicity. *Chem Res Toxicol*. 2014; 27:1958-1966. doi: 10.1021/tx5003063. PMID: 25271104.

- [14] Wu CR, Tsai CW, Chang SW, Lin CY, Huang LC, Tsai CW. Carnosic acid protects against 6-hydroxydopamine-induced neurotoxicity in *in vivo* and *in vitro* model of Parkinson's disease: Involvement of antioxidative enzymes induction. *Chem Biol Interact.* 2015; 225:40-46. doi: 10.1016/j.cbi.2014.11.011. PMID: 25446857.
- [15] Li XL, Liu JX, Li P, Zheng YQ. Protective effect of rosmarinic acid on hypoxia/reoxygenation injury in cardiomyocytes. *Zhongguo Zhong Yao Za Zhi.* 2014; 39:1897-1901. PMID: 25282902.
- [16] El-Demerdash FM, Abbady EA, Baghdadi HH. Oxidative stress modulation by *Rosmarinus officinalis* in creosote-induced hepatotoxicity. *Environ Toxicol.* 2016; 31:85-92. doi: 10.1002/tox.22024. doi: 10.1002/tox.22024. PMID: 25044495.
- [17] Sebai H, Selmi S, Rtibi K, Gharbi N, Sakly M. Protective effect of *Lavandula stoechas* and *Rosmarinus officinalis* essential oils against reproductive damage and oxidative stress in alloxan-induced diabetic rats. *J Med Food.* 2015; 18:241-249. doi: 10.1089/jmf.2014.0040. PMID: 25105335.

- [18] Horvathova E, Navarova J, Galova E, Sevcovicova A, Chodakova L, Snahnicanova Z, et al. Assessment of antioxidative, chelating, and DNA-protective effects of selected essential oil components (eugenol, carvacrol, thymol, borneol, eucalyptol) of plants and intact *Rosmarinus officinalis* oil. *J Agric Food Chem.* 2014; 62:6632-6639. doi: 10.1021/jf501006y. PMID: 24955655.
- [19] Kojic EM, Darouiche RO. *Candida* infections of medical devices. *Clin Microbiol Rev.* 2004; 17:255-267. PMID: 15084500.
- [20] Harriott MM, Noverr MC. *Candida albicans* and *Staphylococcus aureus* form polymicrobial biofilms: effects on antimicrobial resistance. *Antimicrob Agents Chemother.* 2009; 53:3914-3922. doi: 10.1128/AAC.00657-09. PMID: 19564370.
- [21] Ammons MC, Tripet BP, Carlson RP, Kirker KR, Gross MA, Stanisich JJ, et al. Quantitative NMR metabolite profiling of methicillin-resistant and methicillin-susceptible *Staphylococcus aureus* discriminates between biofilm and planktonic phenotypes. *J Proteome Res.* 2014; 13:2973-2985. doi: 10.1021/pr500120c. PMID: 24809402.

- [22] Mastropaolo MD, Evans NP, Byrnes MK, Stevens AM, Robertson JL, Melville SB. Synergy in polymicrobial infections in a mouse model of type 2 diabetes. *Infect Immun*. 2005; 73:6055-6063. PMID: 16113326.
- [23] O'Connell HA, Kottkamp GS, Eppelbaum JL, Stubblefield BA, Gilbert SE, Gilbert ES. Influences of biofilm structure and antibiotic resistance mechanisms on indirect pathogenicity in a model polymicrobial biofilm. *Appl Environ Microbiol*. 2006; 72:5013-5019. PMID: 16820500.
- [24] Chandra J, Kuhn DM, Mukherjee PK, Hoyer LL, McCormick T, Ghannoum MA. Biofilm formation by the fungal pathogen *Candida albicans*: development, architecture, and drug resistance. *J Bacteriol*. 2001; 183:5385-5394. PMID: 11514524.
- [25] Al-Fattani MA, Douglas LJ. Penetration of *Candida* biofilms by antifungal agents. *Antimicrob Agents Chemother*. 2004; 48:3291-3297. PMID: 15328087.
- [26] Katneni R, Hedayati SS. Central venous catheter-related bacteremia in chronic hemodialysis patients: epidemiology and evidence-based management. *Nat Clin Pract Nephrol*. 2007; 3:256-266. PMID: 17457359.
- [27] Klotz SA, Chasin BS, Powell B, Gaur NK, Lipke PN. Polymicrobial bloodstream infections involving *Candida* species: analysis of patients and review of the literature. *Diagn Microbiol Infect Dis*. 2007; 59:401-406. PMID: 17888612.

- [28] Cruz MR, Graham CE, Gagliano BC, Lorenz MC, Garsin DA. *Enterococcus faecalis* inhibits hyphal morphogenesis and virulence of *Candida albicans*. *Infect Immun*. 2013; 81:189-200. doi: 10.1128/IAI.00914-12. PMID: 23115035.
- [29] ten Cate JM, Klis FM, Pereira-Cenci T, Crielaard W, de Groot PW. Molecular and cellular mechanisms that lead to *Candida* biofilm formation. *J Dent Res*. 2009; 88:105-115. doi: 10.1177/0022034508329273. PMID: 19278980.
- [30] Gregoire S, Xiao J, Silva BB, Gonzalez I, Agidi PS, Klein MI, et al. Role of glucosyltransferase B in interactions of *Candida albicans* with *Streptococcus mutans* and with an experimental pellicle on hydroxyapatite surfaces. *Appl Environ Microbiol*. 2011; 77:6357-6367. doi: 10.1128/AEM.05203-11. PMID: 21803906.
- [31] de Carvalho FG, Silva DS, Hebling J, Spolidorio LC, Spolidorio DM. Presence of mutans streptococci and *Candida* spp. in dental plaque/dentine of carious teeth and early childhood caries. *Arch Oral Biol*. 2006; 51:1024-1028. PMID: 16890907.
- [32] Raja M, Hannan A, Ali K. Association of oral candidal carriage with dental caries in children. *Caries Res*. 2010; 44:272-276. doi: 10.1159/000314675. PMID: 20516688.

- [33] Vadiakas G. Case definition, aetiology and risk assessment of early childhood caries (ECC): a revisited review. *Eur Arch Paediatr Dent*. 2008; 9:114-125. PMID: 18793593.
- [34] Parisotto TM, Steiner-Oliveira C, Silva CM, Rodrigues LK, Nobre-dos-Santos M. Early childhood caries and mutans streptococci: a systematic review. *Oral Health Prev Dent*. 2010; 8:59-70. PMID: 20480056.
- [35] Davey ME, O'toole GA. Microbial biofilms: from ecology to molecular genetics. *Microbiol Mol Biol Rev*. 2000; 64:847-867. PMID: 11104821.
- [36] Mah TF, O'Toole GA. Mechanisms of biofilm resistance to antimicrobial agents. *Trends Microbiol*. 2001; 9:34-39. PMID: 11166241.
- [37] Chen AI, Dolben EF, Okegbe C, Harty CE, Golub Y, Thao S, et al. *Candida albicans* ethanol stimulates *Pseudomonas aeruginosa* WspR-controlled biofilm formation as part of a cyclic relationship involving phenazines. *PLoS Pathog*. 2014; 10:e1004480. doi: 10.1371/journal.ppat.1004480. PMID: 25340349.
- [38] da Silva-Boghossian CM, do Souto RM, Luiz RR, Colombo AP. Association of red complex, *A. actinomycetemcomitans* and non-oral bacteria with periodontal diseases. *Arch Oral Biol*. 2011; 56:899-906. doi: 10.1016/j.archoralbio.2011.02.009. PMID: 21397893.

- [39] Raghavendran K, Mylotte JM, Scannapieco FA. Nursing home-associated pneumonia, hospital-acquired pneumonia and ventilator-associated pneumonia: the contribution of dental biofilms and periodontal inflammation. *Periodontol 2000*. 2007; 44:164-177. PMID: 17474932.
- [40] Leclair LW, Hogan DA. Mixed bacterial-fungal infections in the CF respiratory tract. *Med Mycol*. 2010; 48:S125-132. doi: 10.3109/13693786.2010.521522. PMID: 21067324.
- [41] Delhaes L, Monchy S, Fréalle E, Hubans C, Salleron J, Leroy S, et al. The airway microbiota in cystic fibrosis: a complex fungal and bacterial community--implications for therapeutic management. *PLoS One*. 2012; 7:e36313. doi: 10.1371/journal.pone.0036313. PMID: 22558432.
- [42] Chotirmall SH, O'Donoghue E, Bennett K, Gunaratnam C, O'Neill SJ, McElvaney NG. Sputum *Candida albicans* presages FEV₁ decline and hospital-treated exacerbations in cystic fibrosis. *Chest*. 2010; 138:1186-1195. doi: 10.1378/chest.09-2996. PMID: 20472859.

- [43] González-Vallinas M, Molina S, Vicente G, Zarza V, Martín-Hernández R, García-Risco MR, et al. Expression of microRNA-15b and the glycosyltransferase GCNT3 correlates with antitumor efficacy of Rosemary diterpenes in colon and pancreatic cancer. PLoS One. 2014; 9:e98556. doi: 10.1371/journal.pone.0098556. PMID: 24892299.
- [44] Petiwala SM, Berhe S, Li G, Puthenveetil AG, Rahman O, Nonn L, et al. Rosemary (*Rosmarinus officinalis*) extract modulates CHOP/GADD153 to promote androgen receptor degradation and decreases xenograft tumor growth. PLoS One. 2014; 9:e89772. doi: 10.1371/journal.pone.0089772. PMID: 24598693.
- [45] Marrelli M, Cristaldi B, Menichini F, Conforti F. Inhibitory effects of wild dietary plants on lipid peroxidation and on the proliferation of human cancer cells. Food Chem Toxicol. 2015; 86:16-24. doi: 10.1016/j.fct.2015.09.011. PMID: 26408343.
- [46] Berrington D, Lall N. Anticancer activity of certain herbs and spices on the cervical epithelial carcinoma (HeLa) cell line. Evid Based Complement Alternat Med. 2012; 2012:564927. doi: 10.1155/2012/564927. PMID: 22649474.

- [47] Yu MH, Choi JH, Chae IG, Im HG, Yang SA, More K, et al. Suppression of LPS-induced inflammatory activities by *Rosmarinus officinalis* L. Food Chem. 2013; 136:1047-1054. doi: 10.1016/j.foodchem.2012.08.085. PMID: 23122161.
- [48] Razavi-Azarkhiavi K, Behravan J, Mosaffa F, Sehatbakhsh S, Shirani K, Karimi G. Protective effects of aqueous and ethanol extracts of rosemary on H₂O₂-induced oxidative DNA damage in human lymphocytes by comet assay. J Complement Integr Med. 2014; 11:27-33. doi: 10.1515/jcim-2013-0063. PMID: 24497228.
- [49] Furtado RA, de Araújo FR, Resende FA, Cunha WR, Tavares DC. Protective effect of rosmarinic acid on V79 cells evaluated by the micronucleus and comet assays. J Appl Toxicol. 2010; 30:254-259. doi: 10.1002/jat.1491. PMID: 19847787.
- [50] CLSI. Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically. Approved standard, NCCLS document M7-A6. 6th ed. USA: CLSI; 2003.
- [51] CLSI. Reference method for broth dilution in tests for determining the sensitivity to antifungal therapy of yeast. Approved standard, NCCLS document M27-A2. 2nd ed. USA: CLSI; 2002.
- [52] CLSI. Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of yeasts. Fourth Informational Supplement M27-S4. USA: CLSI; 2012.

- [53] Lewis K. Riddle of biofilm resistance. *Antimicrob Agents Chemother.* 2001; 45:999-1007. PMID: 11257008.
- [54] Pereira-Cenci T, Deng DM, Kraneveld EA, Manders EM, Del Bel Cury AA, ten Cate JM, et al. The effect of *Streptococcus mutans* and *Candida glabrata* on *Candida albicans* biofilms formed on different surfaces. *Arch Oral Biol.* 2008; 53:755-764. doi: 10.1016/j.archoralbio.2008.02.015. PMID: 11257008.
- [55] Morales DK, Jacobs NJ, Rajamani S, Krishnamurthy M, Cubillos-Ruiz JR, Hogan DA. Antifungal mechanisms by which a novel *Pseudomonas aeruginosa* phenazine toxin kills *Candida albicans* in biofilms. *Mol Microbiol.* 2010; 78:1379-1392. doi: 10.1111/j.1365-2958.2010.07414.x. PMID: 21143312.
- [56] Saising J, Dube L, Ziebandt AK, Voravuthikunchai SP, Nega M, Götz F. Activity of gallidermin on *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus epidermidis* biofilms. *Antimicrob Agents Chemother.* 2012; 56:5804-5810. doi: 10.1128/AAC.01296-12. PMID: 22926575.
- [57] Luzio JP, Pryor PR, Bright NA. Lysosomes: fusion and function. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2007; 8:622-632. PMID: 17637737.

4.2 Artigo – *Thymus vulgaris* L. extract promotes action on mono- and polymicrobial biofilms of dental interest microorganisms, anti-inflammatory effect and absence of cytotoxicity and genotoxicity*

Biological effects of *Thymus vulgaris* L.

Jonatas Rafael de Oliveira^{a,#}, Daiane de Jesus^a, Ana Paula Réquia Martins^a, Cláudio Antonio Talge Carvalho^b, Cristina Pacheco Soares^c, Samira Esteves Afonso Camargo^a, Antonio Olavo Cardoso Jorge^a, Luciane Dias de Oliveira^a

^aDepartment of Biosciences and Oral Diagnosis, Institute of Science and Technology, Univ Estadual Paulista/UNESP, São José dos Campos, SP, Brazil.

^bDepartment of Restorative Dentistry, Institute of Science and Technology, Univ Estadual Paulista/UNESP, São José dos Campos, SP, Brazil.

^c Institute of Research and Development , Universidade do Vale do Paraíba/UNIVAP, São José dos Campos, SP, Brazil.

Corresponding author

Jonatas Rafael de Oliveira

Universidade Estadual Paulista/UNESP – Instituto de Ciência e

Tecnologia, Departamento de Biociências e Diagnóstico Bucal,

Laboratório de Microbiologia e Imunologia

Av. Engenheiro Francisco José Longo, 777 - Jardim São Dimas

São José dos Campos - SP, Brasil. CEP 12245-000

T. +55 12 3947-9334 / F. +55 12 3947-9010

E-mail: jroliveira16@hotmail.com

Abstract

Objectives: This study was aimed to evaluate antimicrobial activity against mono- and polymicrobial biofilms, cytotoxic profile, anti-inflammatory and genotoxic action of *T. vulgaris* L. extract.

Methods: Monomicrobial biofilms of *Candida albicans*, *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus faecalis*, *Streptococcus mutans* and *Pseudomonas aeruginosa* and polymicrobial biofilms composed by *C. albicans* with each bacteria were formed in microplate wells for 48 h and exposed for 5 min to the plant extract. Murine macrophages (RAW 264.7), human gingival fibroblasts (FMM-1), human breast carcinoma cells (MCF-7) and cervical carcinoma cells (HeLa) were also exposed to different concentrations of

the extract for 5 min and the viability of them was analyzed by MTT, neutral red (NR) and crystal violet (CV) assays. Interleukin-1 beta (IL-1 β) and tumor necrosis factor alpha (TNF- α) produced by RAW 264.7 was quantified by ELISA, after exposure for 24 h to different concentrations of extract in the absence and presence of lipopolysaccharide (LPS) from *Escherichia coli*. The genotoxicity of the extract was evaluated by the frequency of micronucleus (MN) in 1000 cells. The results were analyzed by T-Test or ANOVA and Tukey test ($p \leq 0.05$).

Results: All biofilms showed significant reductions in CFU/mL. The cell viability was above 50% to all cell lines. Immunomodulatory effect in the synthesis of proinflammatory cytokines (IL-1 β and TNF- α) was observed. The frequency of MN was similar or lower than the control group in all cells.

Conclusions: *T. vulgaris* L. extract was effective against all biofilms, promoted cell viability above 50%, exerted immunomodulatory effect and absence of genotoxicity.

Clinical significance: The applicability of *T. vulgaris* L. extract is involved in a possible addition to medical and dental use products, mainly for the control of microbial biofilms. Taking into consideration that its cytotoxic effect is not enhanced, promoting cell viability above 50%, furthermore it featured immunomodulation capability and non-genotoxic effect.

Introduction

T. vulgaris L. (Lamiaceae) is an aromatic perennial plant originates from the Mediterranean region [1], which has been used by the world population as aromatic plant, also as a preservative of food, in addition it is explored as medicinal plant [2]. *Thymus* spp. feature a variety of biocompounds responsible for numerous pharmacological activities. The major constituents are terpenes as thymol, carvacrol, p-cymene, γ -terpinene, caryophyllene, linalool and borneol [2]. Some of their effects were described such as antibacterial [3,4], antiviral [5], antifungal [6-8], anti-inflammatory [9], anticancer [10], anti-hypertensive [11], antioxidant [9], antitumor [9], pro-apoptotic [12], anti-proliferative [12] and anti-nematode [13] activities.

Biofilms are microbial communities attached to a biotic or abiotic surface. The place where this microecosystem is adhered may have its integrity affected by acids generated from the metabolism of host dietary carbohydrates [14].

The biofilm accumulation on the teeth, for example, can cause their demineralization and may induce the caries development [15], especially if it is composed of *S. mutans*, one of the main responsible for this infection. *C. albicans* is commensal inhabitant of mucous, however it can be potentially pathogenic for some patients with some type of immunosuppression, cancer, transplant and hospitalized for a long time. In

the oral cavity it can provoke oropharyngeal candidiasis [16]. *S. aureus* can be obtained in cases of periodontitis, in biofilms supra and subgingival [17,18]. Its association with the implants and biomaterials infections had been described [17]. *E. faecalis* is also responsible for periodontal disease and infection of root canals [19]. *P. aeruginosa*, in supragingival biofilm, can cause a more aggressive form of periodontitis [20].

In polymicrobial biofilms, *S. aureus* can easily adhere to the hyphae of *C. albicans*, thus resulting in a heterogeneous biofilm, which base is composed mainly of hyphae of *C. albicans* and *S. aureus* attached to them [21]. The co-isolation of *C. albicans* and *Enterococcus* spp at a same site of infection was observed in the study by Mason et al. [22], which found a significant increase of enterococcus in the intestinal microbiota of mice antibiotic suppressed and previously inoculated with *C. albicans*. The association of *C. albicans* and *S. mutans*, the yeast seems to favor the development of the biofilm of *S. mutans* [23]. Studies about caries infection have shown that there is a direct association between the presence of these two microorganisms and the development of this disease [24,25,26]. It was reported in cases of cystic fibrosis that the association of *P. aeruginosa* and *C. albicans* may aggravate this disease, causing in the patient increase of loss of lung function [27].

Tumor cell lines of breast carcinoma, MCF-7, and cervical cancer, HeLa, are two of the most studied lines worldwide. MCF-7 was named in honor of Michigan Cancer Foundation, where its generation was achieved

after seven attempts by researcher Herbert D. Soule. It is widely used by numerous research groups since it effectively demonstrates its clinical features [28]. While HeLa is considered as the oldest and most widely tumor cell used. Its name was given in honor of Henrietta Lacks patient, which cervical carcinoma was the source of this tumor line. [29]. Tumor cells are more resistant to drug action [30], so the search for new products such as those derived from medicinal plants can be an alternative to obtain therapeutic success.

It has been reported that natural products may act significantly in controlling inflammatory processes such as the migration of inflammatory cells, in production of chemical mediators and in phagocytosis [31,32,33]. It has also studied the ability of natural products to present antimutagenic effect, in other words, they may provide protective action of the cellular DNA. Phytocompounds of *T. vulgaris* L., as thymol and carvacrol, have been evaluated in order to check their protective effect in response to the damage caused by oxidative stress to DNA [34] or by mutagens agents such as ethyl methanesulfonate [35].

Thus, the aims of this study were: i. evaluate the antimicrobial effect of *T. vulgaris* L. extract on planktonic forms and monomicrobial biofilms of *C. albicans*, *S. aureus*, *E. faecalis*, *S. mutans* and *P. aeruginosa* and in polymicrobial biofilms of *C. albicans* associated with *S. aureus*, *E. faecalis*, *S. mutans* and *P. aeruginosa*; ii. analyze the cytotoxic profile of the extract on RAW 264.7, FMM-1, MCF-7 and HeLa; iii. verify its anti-inflammatory

effect in LPS-stimulated RAW 264.7; and iv. investigate its genotoxic effect on the four cell lines.

Material and methods

Extract

T. vulgaris L. extract was commercially acquired (Florien, Piracicaba, Brazil) at the concentration of 200 mg/mL in propylene glycol. This extract was obtained from leaves of the plant.

Antimicrobial activity

Antimicrobial activity was evaluated on reference strains (ATCC - American Type Culture Collection) of *C. albicans* (ATCC 18804), *S. aureus* (ATCC 6538), *E. faecalis* (ATCC 4083), *S. mutans* (ATCC 35688) and *P. aeruginosa* (ATCC 15442) from the Laboratory of Microbiology and Immunology, Institute of Science and Technology/UNESP. Strains were kept frozen (-80°C) in Brain Heart Infusion broth (BHI - Himedia, Mumbai, India) with 20% glycerol, for bacteria, and Yeast Extract Peptone Dextrose broth (YPD - Himedia) with 16% glycerol, for *C. albicans*.

Broth microdilution method

This method was performed according to the Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI), protocols M7-A6 [36] and M27-A2 [37] supplemented by M27-S4 [38]. For this, bacteria were grown in BHI agar and yeast in Sabouraud dextrose agar (SD - Himedia) for 24 h at 37°C with 5% CO₂ for *S. mutans*. Then, microbial suspension was prepared in sterile saline (0.9% NaCl) which turbidity was adjusted to 10⁶ CFU/mL (colony forming units per milliliter) in a spectrophotometer (Micronal, São Paulo, Brazil). Thereafter, 100 µL of culture medium were placed on a 96-well plate (TPP, Trasadingen, Switzerland), broth Mueller Hinton (Himedia) for bacteria and RPMI 1640 (with glutamine, without bicarbonate and phenol red indicator) (Himedia) buffered with MOPS [3-(N-morpholino) propanesulfonic acid] (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA) at pH 7.0 ± 0.1, for yeasts. Then, 100 µL of *T. vulgaris* L. extract were placed only in the first column, from which serial dilutions (1:2) started to the tenth dilution. At last, 100 µL of the standardized microbial suspension were added into each well. Thus, the inoculum concentration was approximately 5 x 10⁵ CFU/mL for bacteria, and 5 x 10² to 2.5 x 10³ CFU/mL for yeast. The concentrations of the extract were diluted from 50 to 0.09 mg/mL and wells for growth control (C-, medium plus inoculum) and medium (C+, medium alone), were added. After 24 h incubation, the minimum inhibitory concentration (MIC) was determined in the last well of the microplate that

was not observed turbidity. To determine the minimum microbicidal concentration (MMC) were seeded 100 μ L of the MIC and concentrations above on agar BHI or SD. After 48 h incubation, the MMC was determined in the plate seeded with lower concentration, where microbial growth has not been observed.

Mono- and polymicrobial biofilms formation

Monomicrobial biofilms of *C. albicans*, *S. aureus*, *E. faecalis*, *S. mutans* and *P. aeruginosa* were formed, as well as, polymicrobial biofilms composed of *C. albicans* associated with *S. aureus*, *E. faecalis*, *S. mutans* and *P. aeruginosa*. Firstly, the strains were grown on solid medium and subsequently in broth medium, being BHI agar and broth for bacteria, and SD agar and Yeast Nitrogen Base broth (YNB - Himedia) for yeast, for 24 h at 37°C (5% CO₂ for *S. mutans*). Then, the microbial suspensions were centrifuged at 2000 rpm/10 min (MPW-350, Warsaw, Poland), the supernatant was discarded and the pellet was suspended in saline. This process was performed twice. Thereafter, the microbial suspension was adjusted to 10⁷ CFU/mL using a spectrophotometer and 200 μ L of it were added in microplate wells, which was maintained in shaking (37°C; 75 rpm - Quimis, Diadema, Brazil) for 90 min for initial adhesion of biofilms. For polymicrobial biofilms, 100 μ L of each standardized inoculum were added. Subsequently, the supernatant was discarded and 200 μ L of BHI broth or

YNB were added to biofilm development, in polymicrobial biofilms equal parts of this culture media were used. After 24 h incubation the culture medium was replaced by fresh medium. The biofilm was cultivated for 48 h in shaking, then it was exposed for 5 min at a concentration of 200 mg/mL of *T. vulgaris* L. extract (n = 10) and saline was used as control (n = 10). After washing with sterile saline to remove affected cells by exposure, the biofilm was disaggregated by the ultrasonic homogenizer (HD 2200 – Bandelin Eletronic, Berlin, Germany) with 25% power for 30 s, the microbial suspension generated was serially diluted (1:10) and 100 µL were seeded on agar BHI or SD. In the case of multispecies biofilms, selective media (agar) were used, as SD with chloramphenicol (1%) for *C. albicans*, BHI with 75 mg NaCl/mL medium for *S. aureus*, *Mitis salivarius* with 20% sucrose and 0.2 international units (IU) of bacitracin/mL medium for *S. mutans*, m-Enterococcus (Difco) for *E. faecalis* and MacConkey (Difco) for *P. aeruginosa*. After 48 h incubation the UFC were counted and CFU/mL were calculated.

Cell viability

Cell lines

Human gingival fibroblasts (FMM-1) from the Dentistry College of University of São Paulo (USP, São Paulo, Brazil), murine macrophages

(RAW 264.7) from the Rio de Janeiro Cell Bank (APABCAM, Rio de Janeiro, Brazil), human breast carcinoma cells (MCF-7) and cervical carcinoma cells (HeLa) from Adolfo Lutz Institute (São Paulo, SP, Brazil) were used. The cells were cultured in Dulbecco's modified Eagle medium (DMEM – LGC Biotechnology, Cotia, Brazil) supplemented with 10% fetal bovine serum (Invitrogen, New York, USA) and 1% penicillin-streptomycin (Gibco, Grand Island, NY, United States). They were maintained in cell culture flasks (TPP) under incubation (37°C and 5% CO₂) and atmospheric humidity up to their subconfluent. Then, the cell monolayer of RAW 264.7 was disaggregated with cell scraper (TPP), and the cell monolayer of FMM-1, MCF-7 and HeLa cells with trypsin (LGC Biotechnology). The suspension was centrifuged at 2000 rpm/5 min (Hermle - Z-300 - Labnet, Edison, USA), the supernatant was discarded and the pellet was suspended in fresh medium. Then, viable cell counts were made by exclusion method with Trypan Blue (0.5%, Sigma-Aldrich).

Exposure to T. vulgaris L. extract

In 96-well plates 200 µL of DMEM with 4×10^4 viable cells were added in each well and kept under incubation for 24 h. Thereafter, the supernatant was discarded, *T. vulgaris* L. extract diluted in DMEM at concentrations of 25, 50 and 100 mg/mL was added (n = 10/group), DMEM was used as control (0 mg/mL) and after 5 min of exposure the

supernatant was discarded, the wells were washed with PBS. Subsequently, three different cell viability tests were applied separately, as described hereafter.

MTT assay

This method analyzed the cell viability by the reduction of MTT salt in formazan, by reductases present in viable cells. After washing for removing affected cells, 100 μ L of MTT solution [bromide of 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide] (Sigma Aldrich) at a concentration of 0.5 mg/mL phosphate buffered saline (PBS - LGS Biotechnology) were added. After incubation for 1 h under protection from light, the MTT solution was removed and 100 μ L/well of dimethyl sulfoxide (DMSO - Sigma Aldrich) were added. There was further incubation for 10 minutes, followed by shaking (Solab, Piracicaba, Brazil) for 10 minutes. Then, the absorbance of the wells was read in spectrophotometer microplate (Bio-Tek, Vermont, USA) at 570 nm. The optical density values obtained from each well were converted into percent of cell viability.

Neutral red (NR) assay

This method allow us verify the lysosomal activity of viable cells by the incorporation of NR in the lysosomes. Thus, the NR powder

(Vetec/Sigma-Aldrich, SP, Brazil) was suspended in PBS at a concentration of 20 µg /mL. Then 100 µL/well of this solution were added and the plates were incubated for 2 h protected from light. Subsequently, the solution was removed and 100 µL/well of pure ethyl alcohol were added. After 15 min in shaker, the absorbance of the wells was analyzed in a spectrophotometer ($\lambda = 570$ nm). The obtained values were converted to percentage of cell viability.

Crystal violet (CV) assay

By this method it was possible to verify cell viability by staining DNA of viable cells. The CV powder (Synth, SP, Brazil) was suspended in water distilled at concentration of 0.2 mg/mL, and 100 µL/well of this solution were added on cells previously fixed by 10% formaldehyde (Synth) for 10 min. After 15 min incubation, the supernatant was discarded and the wells were washed with distilled water until the moment at which the water no longer presented violet staining. Then, 100 µL/well of pure ethyl alcohol were added and after stirring in shaker for 10 min, the absorbance of the wells was analyzed in a spectrophotometer ($\lambda = 570$ nm). The obtained values were converted to percentage of cell viability.

Anti-inflammatory activity

Preparation of experimental groups

In 24-well plates (TPP) were cultured RAW 264.7 (5×10^5 cells/mL) in DMEM for 24 h under appropriate incubation conditions. Subsequently, in the groups with no lipopolysaccharide (LPS – Sigma-Aldrich) from *Escherichia coli*, the supernatant was discarded and DMEM containing *T. vulgaris* L. extract at concentrations of 25, 50 and 100 mg/mL was added ($n = 10$ / group), DMEM was used as control (0 mg/mL) ($n = 10$). In the groups with LPS, it was added at the concentration of 1 $\mu\text{g/mL}$ in the extract dilutions ($n = 10/\text{group}$). During 24 h the cells were exposed to this concentrations, after that the supernatant was collected and stored in microtubes at -20°C for later measurement of proinflammatory cytokines (IL-1 β and TNF- α).

ELISA assay

Supernatants from RAW 264.7 were analyzed by enzyme immunoassay ELISA (sandwich method) and levels of proinflammatory cytokines, IL-1 β and TNF- α , were measured with commercial kits (R&D Systems, Minneapolis, USA), catalog DY401 for IL-1 β and catalog DY410 for TNF- α , according to manufacturer's guidance. The absorbance of the

wells was read in a spectrophotometer ($\lambda = 450 \text{ nm}$). The obtained values were converted to picograms per milliliter (pg/mL), taking into account the standard curve values for IL-1 β or TNF- α , using the GraphPad Prism 5.0 program.

Genotoxicity - micronucleus (MN) assay

MN assay was performed in all cell lines separately. For this, DMEM containing 2×10^4 cells/mL was added in 24-well plates for 24 h. After discarding the supernatant, DMEM containing concentrations of 25, 50, 100 mg/mL of *T. vulgaris* L. extract was added ($n = 2/\text{group}$), DMEM was used as control (0 mg/mL) ($n = 2$). After 24 h, the supernatant was discharged, the monolayer was washed with PBS and fixed with 10% formaldehyde for 10 min at room temperature. After further washing the monolayer, 200 μL of PBS and one drop of fluoroshield with DAPI (Sigma-Aldrich) were added in each well. Protected from the light, the plate was taken to stir for 5 min. Then, the frequency of MN, stained blue by DAPI, was verified inside 1000 cells, with fluorescence microscope (Axiovert 200 - Zeiss, Jena, Germany).

Statistical analysis

The results were presented as mean values (\pm standard deviation), they were statistically analyzed with GraphPad Prism 5.0 and Minitab 17, considering statistically significant difference when $p \leq 0.05$. Antimicrobial activity data were analyzed by T-Test or ANOVA complemented by Tukey Test. Cell viability, anti-inflammatory activity and genotoxicity data were analyzed by ANOVA and Tukey Test.

Results

Antimicrobial activity

T. vulgaris L. extract at 50 mg/mL promoted growth inhibition of *C. albicans*. However, for other evaluated microorganisms the MIC and MMC have presented values >50 mg/mL. Regarding the monomicrobial biofilms of *C. albicans*, *S. aureus*, *E. faecalis*, *S. mutans* and *P. aeruginosa*, there was a significant reduction in the number of CFU/mL after 5 min of exposure to *T. vulgaris* L. extract, compared to the untreated group (Fig. 1). However, reduction percentage presented by the biofilms was homogeneous (Fig. 2).

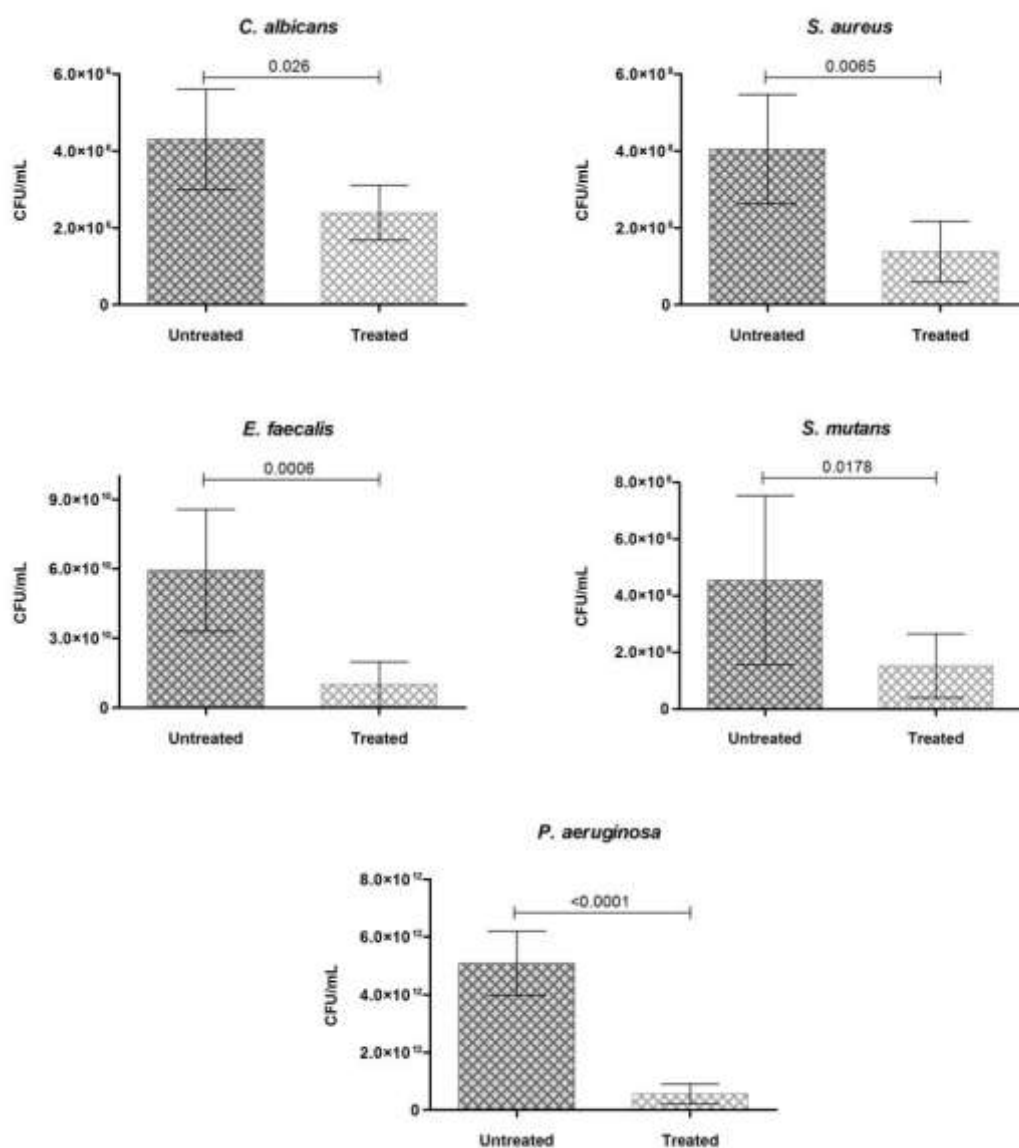


Fig. 1. Mean (\pm standard deviation) of CFU/mL of monomicrobial biofilms of *C. albicans*, *S. aureus*, *E. faecalis*, *S. mutans* and *P. aeruginosa* presented in the untreated group (0.9% NaCl) and in the treated group with *T. vulgaris* L. extract (200 mg/mL) for 5 min. *p* values follow on the columns ($n = 10$. T-Test, $p \leq 0.05$).

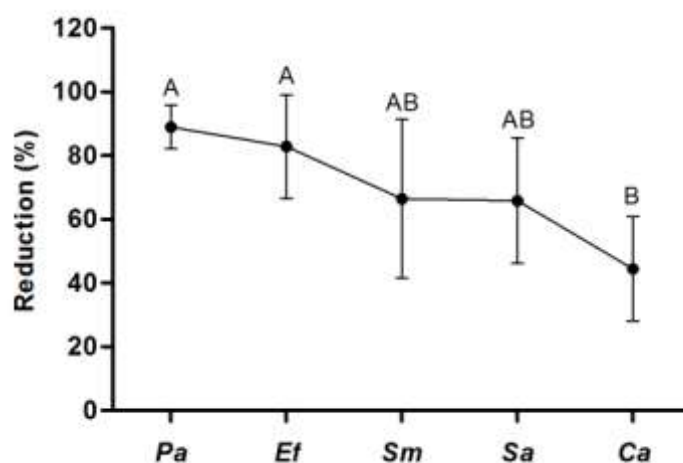


Fig. 2. Reduction percentage of monomicrobial biofilm of *C. albicans* (*Ca*) *S. aureus* (*Sa*), *E. faecalis* (*Ef*), *S. mutans* (*Sm*) e *P. aeruginosa* (*Pa*) after exposure to *T. vulgaris* L extract. (200 mg/mL) for 5 min. The groups were reunited according to their homogeneity. Different superscript letters indicate statistically significant differences between experimental groups. (n = 10. ANOVA, Tukey test, $p \leq 0.05$).

Polymicrobial biofilms composed of *C. albicans* in association with *S. aureus*, *E. faecalis*, *S. mutans* and *P. aeruginosa* also showed significant reductions in CFU/mL after exposure to *T. vulgaris* L. extract (200 mg/mL) for 5 min, compared to the control group (Fig. 3). The percentage reduction of yeast and each bacterium in polymicrobial biofilm was similar, except for the association of *C. albicans* with *P. aeruginosa*.

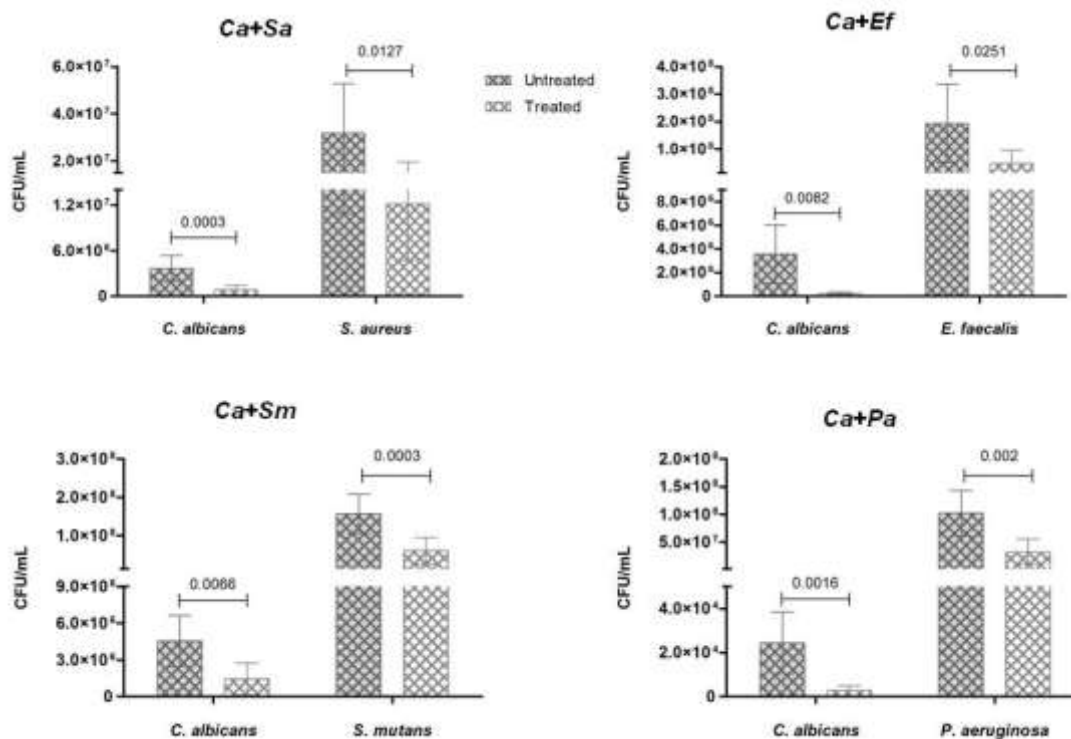


Fig. 3. Mean (\pm standard deviation) of CFU/mL of polymicrobial biofilms composed for *C. albicans* associated with *S. aureus*, *E. faecalis*, *S. mutans* and *P. aeruginosa* presented in the untreated group (0.9% NaCl) and in the treated group with *T. vulgaris* L. extract (200 mg/mL) for 5 min. p values follow on the columns. ($n = 10$. T-Test, $p \leq 0.05$).

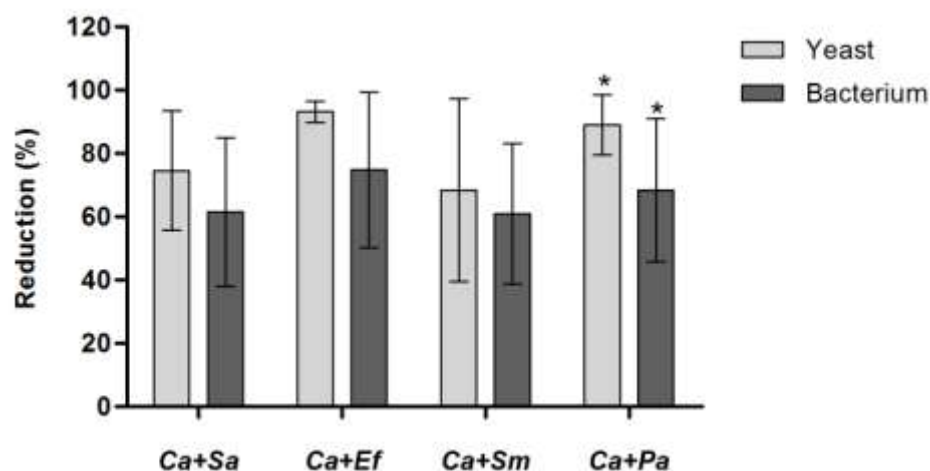


Fig. 4. Reduction percentage of polymicrobial biofilm of *C. albicans* associated with *S. aureus* (Ca+Sa), *E. faecalis* (Ca+Ef), *S. mutans* (Ca+Sm) and *P. aeruginosa* (Ca+Pa). It is possible to analyze the reductions of yeast and each bacterium after exposure to *T. vulgaris* L. extract (200 mg/mL) for 5 min. Asterisks indicate statistically significant difference between the reductions of yeast and bacterium in each polymicrobial association. (n = 10. T-Test, $p \leq 0.05$).

Cell viability

In Fig. 5, cell viability percentages obtained in the cell lines can be verified by the MTT (Fig. 5A), NR (Fig. 5B) and CV assays (Fig. 5C), in the groups treated with different concentrations of *T. vulgaris* L. extract. (25, 50 and 100 mg/mL) compared to the control group (0 mg/mL). A decrease in the cell viability percentage of RAW 264.7 could be noticed in the concentrations of 100 (MTT, NR and CV), 50 (MTT, NR and CV) and 25 mg/ml (MTT). In the FMM-1 culture was observed decrease of the cell viability percentage after exposure to 100 (MTT and CV), 50 (MTT and CV) and 25 mg/mL (MTT and CV), however in the NR test there was no

significant reduction of cell viability. Regarding the MCF-7, reduction of cell viability was identified after contact with a concentration of 100 (MTT, NR and CV), 50 (MTT and NR) and 25 mg/mL (NR). The HeLa line had its viability decreased with application of 100 (MTT and NR) and 50 mg/mL (NR and CV). Additionally, it was found that in all experimental groups there was cell viability above 50%.

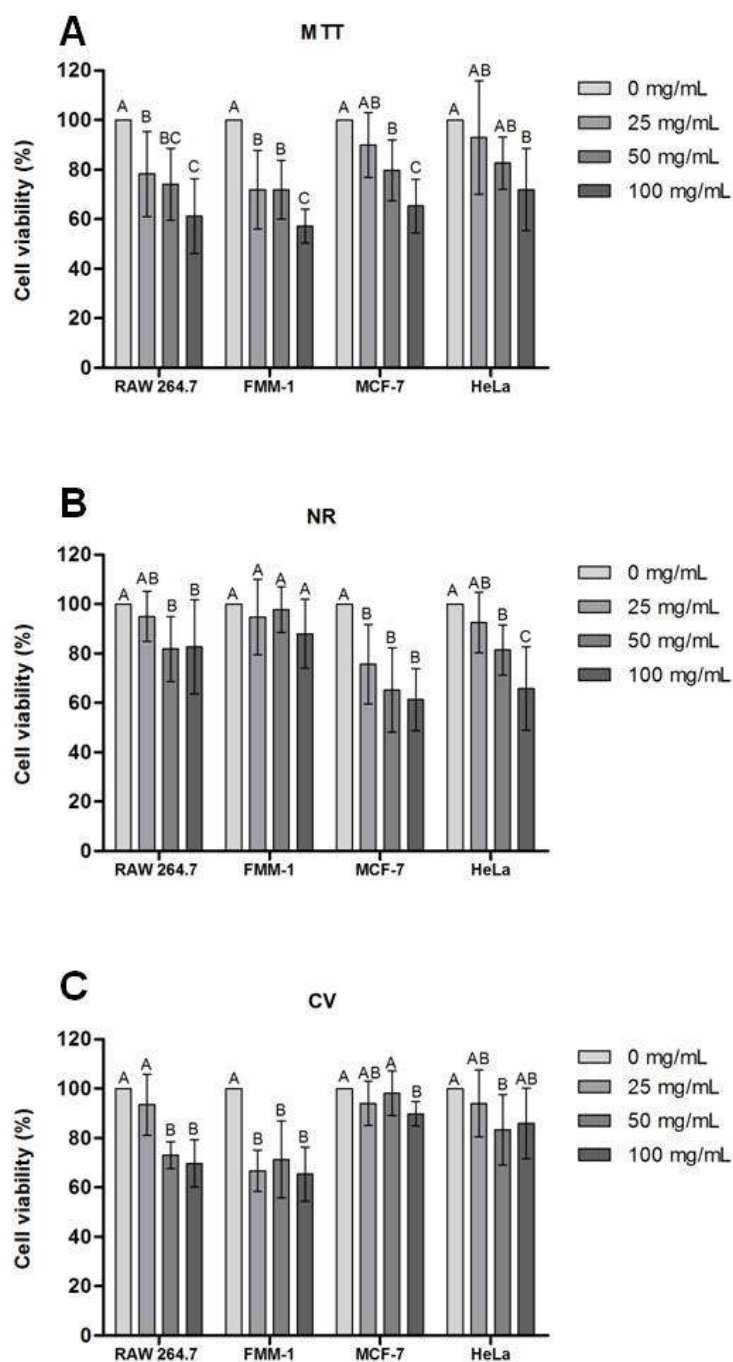


Fig. 5. Cell viability percentage of RAW 264.7, FMM-1, MCF-7 and HeLa obtained after exposure to different concentrations of *T. vulgaris* L. extract for 5 min, on the tests: MTT (A), neutral red, NR (B) and crystal violet, CV (C). Different superscript letters indicate statistically significant differences between experimental groups. (n = 10. ANOVA, Tukey Test, $p \leq 0.05$).

Cell viability of cultures in each one of the concentrations of the *T. vulgaris* L. extract obtained in the tests MTT, NR and CV, can be analyzed in Fig. 6. In the MTT assay (Fig. 6A), the percentages obtained in concentrations of 25, 50 and 100 mg/mL were statistically similar between cell lines tested. In the NR assay (Fig. 6B), the cell lines exhibited similar percentage of cell viability after exposure to 25 and 50 mg/mL, except MCF-7, whose viability was lower in both cases. In contact with 100 mg/mL, MCF-7 also showed lower viability than RAW 264.7 and FMM-1. In addition, its cell viability was similar to of HeLa. Regarding CV assay (Fig. 6C) at 25 mg/mL, FMM-1 exhibited the lowest cell viability percentage, at 50 mg/mL it was noticed that MCF-7 presented the highest percentage of cell viability than other cells, at 100 mg/mL the highest percentage of cell viability was observed in HeLa and MCF-7 than in RAW 264.7 and FMM-1.

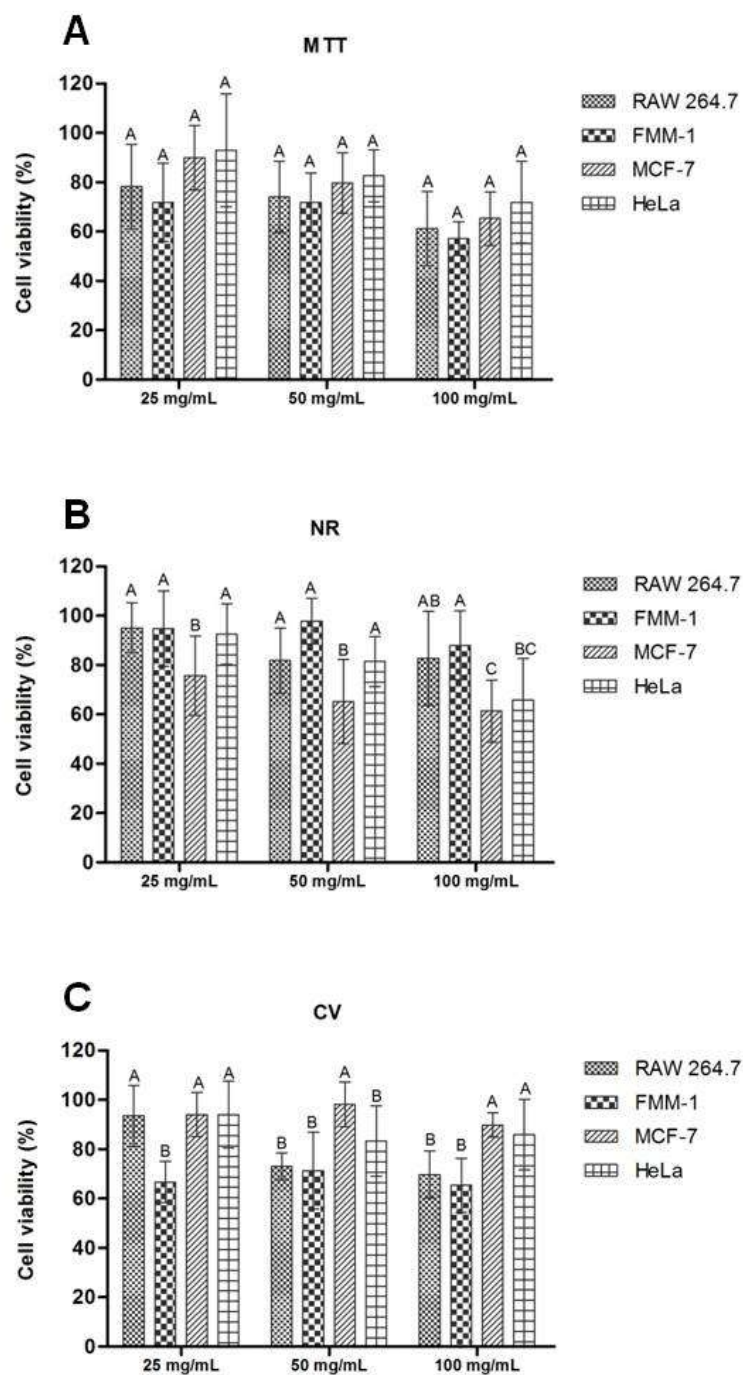


Fig. 6 Cell viability percentage of RAW 264.7, FMM-1, MCF-7 and HeLa obtained from each concentration of *T. vulgaris* L. extract after exposure for 5 min in the tests: MTT (A), neutral red, NR (B) and crystal violet, CV (C). Different superscript letters indicate statistically significant differences between experimental groups. (n = 10. ANOVA, Tukey Test, $p \leq 0.05$).

Anti-inflammatory activity

Quantifying the production of the pro-inflammatory cytokines, IL-1 β and TNF- α , after 24 h of exposure to concentrations of 25, 50 and 100 mg/mL of *T. vulgaris* L. extract is described in Table 1. These data revealed increase of IL-1 β production with the application of the highest concentration evaluated. However, after LPS stimulation and treatment with the concentrations of the extract, the synthesis of this cytokine was inhibited in all treated groups. The plant extract also promoted significant inhibition of TNF- α production. In addition, in the LPS-stimulated groups, it was identified an inhibitory effect in the production of this cytokine in the treated groups with the concentrations of the extract. The findings may indicate anti-inflammatory action of *T. vulgaris* L. extract.

Table 1. Mean (\pm standard deviation) of production of pro-inflammatory cytokines IL-1 β and TNF- α (pg/mL) by RAW 264.7, in the absence and presence of LPS, after contact with concentrations of 25, 50 or 100 mg/mL of *T. vulgaris* L. extract for 24 h. Statistically significant differences between the experimental groups can be observed with different superscript letters. (n = 10. ANOVA, Tukey Test, $p \leq 0.05$).

Group (mg/mL)	Cytokine (pg/mL)			
	IL-1 β		TNF- α	
	no LPS	LPS	no LPS	LPS
0	1.97 \pm 0 ^B	70.42 \pm 14.75 ^A	501.23 \pm 98.31 ^A	22140.37 \pm 788.51 ^A
25	1.97 \pm 0 ^B	28.03 \pm 8.59 ^B	94.82 \pm 13.92 ^B	4466.91 \pm 155.25 ^B
50	1.97 \pm 0 ^B	2 \pm 0.11 ^C	158.41 \pm 62.07 ^B	824.40 \pm 198.88 ^C
100	3.03 \pm 1.72 ^A	2 \pm 0.11 ^C	4.94 \pm 7.19 ^C	12.16 \pm 29.08 ^D

Genotoxicity

MN frequency developed by RAW 264.7, FMM-1, MCF-7 and HeLa after contact for 24 h with concentrations of 25, 50 and 100 mg/mL of *T. vulgaris* L. extract can be observed in Fig. 7A. Results revealed that the MN frequency in the cell lines was similar in all experimental groups, except in FMM-1, where the MN frequency was lower on the concentration of 50 mg/mL, compared to 25 mg/mL and control group (0 mg/mL). In addition, it was noticed that at 100 mg/mL the formation of MN was not observed. In Fig. 7B, MN frequency may be noted in each concentration of *T. vulgaris* L. extract. In the control groups (0 mg/mL), FMM-1 cells presented the higher MN frequency than other lines. At concentrations of 25 and 50 mg/mL, the highest MN frequency was noted in RAW 264.7 and FMM-1. Additionally, at 100 mg/mL there was no formation of MN in the four cell cultures tested.

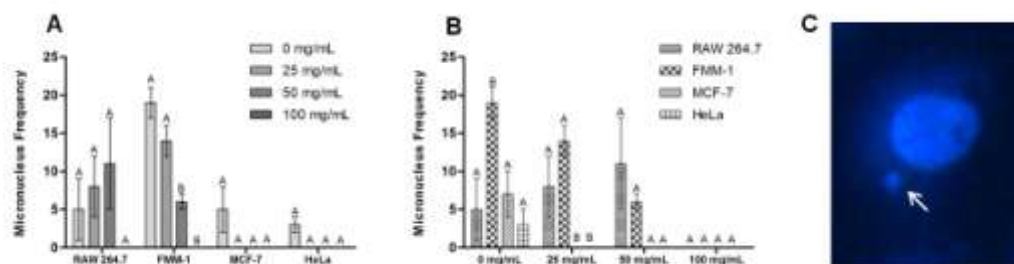


Fig. 7. Micronucleus (MN) frequency obtained after 1000 cell counted in untreated cell cultures (0 mg/mL) or treated with *T. vulgaris* L. extract (25, 50 and 100 mg/mL) for 24 h. (A) MN frequency obtained of cell lines after contact with the concentrations of the vegetal extract. (B) MN frequency presented by cell lines in each analyzed concentration. (C) The white arrow indicates a MN developed around and close to the cell nucleus viewed by fluorescence microscopy (200X) after addition of DAPI. Different superscript letters indicate statistically significant differences between experimental groups. (n = 2. ANOVA, Tukey Test, $p \leq 0.05$).

Discussion

In this study, *T. vulgaris* L. extract showed antimicrobial effect on biofilms *in vitro*, with significant reductions of CFU/mL in monomicrobial biofilms of *C. albicans*, *S. aureus*, *E. faecalis*, *S. mutans* and *P. aeruginosa* (Fig. 1 and 2) and polymicrobial biofilms (Fig. 3 and 4) composed by *C. albicans* associated with *S. aureus*, *E. faecalis*, *S. mutans* and *P. aeruginosa*.

T. vulgaris L. has demonstrated effective action of microbial biofilms, as observed in our study. Khan et al. [39] also showed that *T. vulgaris* L. acted on *C. albicans* biofilm, however in that study the authors found that the *T. vulgaris* L. essential oil provided *in vitro* inhibition of the

biofilm formation of clinical isolates of *C. albicans*, resistant to antifungal agents. The authors scored biofilm formation capacity as "weak", "moderate" or "strong", so among the clinical isolates, 13 were classified as "strong" or "moderate" capacity, three as "weak" and two did not form biofilms. Additionally, sub-MIC of essential oil was applied on strains characterized as "strong" and it was found that these concentrations caused significant reductions between 7.5% and 25%.

Previous study *in vitro* demonstrated the action of the essential oil of *T. vulgaris* L. on formed biofilm of *S. aureus* and *P. aeruginosa* was more effective than the antibiotic ampicillin [40]. These authors demonstrated significant reductions of these biofilms, as was presented on our study, despite we have used glycolic extract.

On *S. mutans*, we found a significant reduction in its formed biofilm after treatment with *T. vulgaris* L. extract. However, besides action on the formed biofilm, it was verified that this plant extract may also impair the initial adherence of this bacterium and consequently prevent biofilm formation [41]. These authors found that the aqueous extract of this plant promoted decrease of viability of this biofilm nearly 96% after 48 h exposure. Nevertheless, we could demonstrate inhibition of almost 70%, with only 5 min of exposure. In addition, Hammad et al. [41] perceived adherence reduction of *S. mutans* to oral epithelial cells after use of dentifrice containing 20% *T. vulgaris* L. extract (45%).

In this study, we demonstrated the effect of the plant extract on biofilm of *E. faecalis* or in its association with *C. albicans*, with significant reductions compared to the untreated group. In the literature this effect has not been reported yet, only its action in planktonic cells was mentioned [42,43].

Different species of microorganisms in a polymicrobial biofilm can provide increase of resistance to effects of antimicrobial agents or to the host immune system [21], however in this study we could noticed that *T. vulgaris* extract was able to overcome the resistance provided by biofilm and caused damage resulting in cell reduction after exposure to the extract (Fig. 2 and 4). Microorganisms in association may interfere at the development of each other [44,45]. Taking this into account, we noted that in associations of *C. albicans* with each bacterium there was an increase of reduction of *C. albicans* compared to its monomicrobial biofilm. It was also noted that the reduction percentage of the bacteria remained similar to their monomicrobial biofilms. In polymicrobial biofilms the reduction percentages were statistically similar between yeast and bacterium, except the association of *C. albicans* with *P. aeruginosa*, where the yeast had higher reduction percentage than the bacterium. In this case, besides the interference of the plant extract, it can be suggested that substances produced by *P. aeruginosa* may have affected the development of the yeast in the biofilm, since *P. aeruginosa* can produce a antifungal substance, phenazine, which has been indicated as responsible for

affecting the process of cellular respiration and hyphae formation in *C. albicans* [46].

Regarding cell viability analysis of RAW 264.7, FMM- 1, MCF -7 and HeLa, after exposure to the extract, three additional tests were used: MTT, for reduction of MTT salt in formazan, by enzymatic activity; NR, by the incorporation of neutral red dye in lysosomes; and CV, causes staining of the DNA. All these products are metabolized or incorporated by viable cells only. Overall, it was observed on all three assays, the higher the concentration of the extract promoted higher reduction of the viability of cell cultures, and all experimental groups have shown cell viability above 50% (Fig. 5). Comparing the viability of cell lines by MTT assay, no significant differences were observed between them in the treated groups, as shown in Fig. 6A. The cultures reductions suggest that the metabolism of these cells was similarly affected by the concentrations used. In the evaluation by NR assay, it was found that MCF-7 showed the lowest percentage of cell viability, compared to the other cells, after treatment with 25 and 50 mg/mL. At the concentration of 100 mg/mL, the cell viability of MCF -7 was lower than of RAW 264.7 and FMM- 1.

Thus, we verified that the concentrations of *T. vulgaris* L. extract significantly affected the lysosomal activity of MCF-7 and HeLa. Therefore, new studies related to alternative and complementary therapy can be developed considering this cellular structure as a possible target for interaction with therapeutic molecules, since, many medications reach the

lysosomes by endocytosis, and may be inactivated by enzymatic degradation, especially by acid hydrolases, or have its entry into the cytosol controlled by these enzymes [47,48].

Analysis performed by the CV assay, identified that MCF-7 and HeLa showed higher cell viability percentage than other cells at 100 mg/mL, MCF-7 was less affected by the concentration of 50 mg/mL and FMM-1 showed lower cell viability percentage than other cells, after treatment with 25 mg/mL. Thus, we suggest that some concentrations of the herbal extract did not produce significant DNA damage, mainly in MCF-7 and HeLa, which exhibited greater resistance to damage in their genetic material than other cells, thereby, it would be necessary think of another target interaction for their elimination. It was reported that tumor lines typically are able to develop multidrug resistance to therapeutic agents [30], because they have a complex network of protein that regulates several resistance mechanisms and controls of apoptosis [49]. HeLa has shown resistance to the action of natural products such as *T. vulgaris* L. extract, which caused low cytotoxicity on it [50], therefore higher concentrations of this extract is requested to control its proliferation [51].

In the investigation of anti-inflammatory activity of *T. vulgaris* L. extract, RAW 264.7 cultures were exposed to LPS (1 µg/mL), to induce secretion of proinflammatory cytokines (IL-1β and TNF-α), and to different concentrations of *T. vulgaris* L. extract, to verify its inhibitory effect of this

secretion (Table 1). Thus, although in the non-LPS-stimulated group at the concentration of 100 mg/mL there was increase production of IL-1 β , compared to the other concentrations, it was found that the LPS-stimulated groups at all concentrations were able to control significantly the production of this cytokine, compared to the control group (0 mg/mL). Likewise, the vegetal extract provided inhibition of TNF- α production in the presence and absence of LPS. It was revealed that all concentrations of extract were able to inhibit the synthesis of this cytokine, even in the non-LPS-stimulated group. In the LPS-stimulated group the inhibition was directly proportional to the concentration used. Therefore, we could demonstrate the anti-inflammatory profile of *T. vulgaris* L. extract, which was capable of controlling IL- β and TNF- α synthesis by cells both in the presence or absence of inflammatory stimulators.

Anti-inflammatory effect of *T. vulgaris*, *T. zygis* and *T. hyemalis* extracts had been also confirmed by Ocaña and Reglero [52], whose study identified significant reduction of proinflammatory cytokines (IL-1 β , IL-6 and TNF- α) and increase of anti-inflammatory (IL-10) after treatment for 24 h with the extracts by human monocytes (THP-1), differentiated into macrophages by phorbol myristate acetate and stimulated by oxidized low density lipoprotein (LDL-ox). In addition, after 48 h of treatment, it was found similar levels of IL-1 β and TNF- α to the baseline level of non-activated cells. Anti-inflammatory activity of *T. vulgaris* L. is not restricted to their extracts, since its essential oil has also demonstrated effectiveness

in control of the production of IL-1 β , IL-8 and TNF- α by LPS-stimulated THP-1 or by *Propionibacterium acnes*-stimulated [53].

Regarding possible damage to DNA caused by exposure to concentrations of *T. vulgaris* L. extract, it was observed MN frequency per 1000 cells counted (Fig. 7). In all cell lines evaluated, the MN frequency was similar or lower than of the untreated group (0 mg/mL). Therefore, we suggest that this plant extract, in the concentrations evaluated, provided DNA-protective effect, eliminating the possibility of neoplastic changes in non-tumor cells. In addition, in MCF-7 and HeLa there was MN formation only in the control group, demonstrating that the extract can also inhibit the DNA damage of these cells and contribute to decrease its mutagenicity. This protective effect has been demonstrated by thymol phytochemical present in *T. vulgaris* L. Thus, it may be suggested being one of the responsible of protection of DNA damage. As shown in a study where keratinocytes (NCTC 2544) previously treated with either thymol and *T. vulgaris* L. extract were irradiated by ultraviolet light A and B and the MN formation was significantly similar to the untreated group, demonstrating the protective effect of both products [54]. This effect was also observed on human lymphocytes, after exposure to different concentrations of thymol for 48 hours, whose MN formation was significantly lower than in the group exposed to ethyl methanesulfonate, a substance known as inducer of mutagenicity [35].

The demonstration of effective biological activities of *T. vulgaris* L. extract allows us think in its future applications, especially in its addition in medical and dental products, in order to improvement of materials, to replacement of ineffective and harmful products and in to the conscious use of natural products, as medicinal plants being an alternative way of utilization.

Conclusion

T. vulgaris L. extract exhibited effective biological activities. In this study, it was found that this vegetal extract acted effectively on the control of monomicrobial biofilms of *C. albicans*, *S. aureus*, *E. faecalis*, *S. mutans* and *P. aeruginosa* and polymicrobial biofilms composed by *C. albicans* with each bacterium, with significant reductions in CFU/mL. It was observed that the extract promoted cell viability above 50%, besides immunomodulatory effect on the production of proinflammatory cytokines (IL-1 β and TNF- α) by LPS-stimulated RAW 264.7. Additionally, genotoxic effect was not observed on any cell line analyzed, thus suggesting DNA-protective effect.

References

- [1] Ismaili H, Milella L, Fkih-Tetouani S, Ildrissi A, Camporese A, Sosa S, et al. *In vivo* topical anti-inflammatory and *in vitro* antioxidant activities of two extracts of *Thymus satureioides* leaves. *Journal of Ethnopharmacology* 2004; **91**:31-6.
- [2] Jamali CA, El Bouzidi L, Bekkouche K, Lahcen H, Markouk M, Wohlmuth H, et al. Chemical composition and antioxidant and anticandidal activities of essential oils from different wild Moroccan *Thymus* species. *Chemistry & Biodiversity* 2012; **9**:1188-97.
- [3] Al Laham SA, Al Fadel FM. Antibacterial activity of various plants extracts against antibiotic-resistant *Aeromonas hydrophila*. *Jundishapur Journal of Microbiology* 2014; **7**:e11370.
- [4] de Las Mercedes OM, Carezzano ME, Giuliano M, Daghero J, Zygadlo J, Bogino P, et al. Antimicrobial activity of essential oils of *Thymus vulgaris* and *Oreganum vulgare* on phytopathogenic strains isolated from soybean. *Plant Biology (Stuttgart, Germany)* 2015; **17**:758-65.
- [5] Sánchez G, Aznar R. Evaluation of natural compounds of plant origin for inactivation of enteric viruses. *Food and Environmental Virology* 2015. PMID: 25636749.
- [6] Maissa BJ, Walid H. Antifungal activity of chemically different essential oils from wild Tunisian *Thymus* spp. *Natural Product Research* 2015; **29**:869-73.

- [7] Kohiyama CY, Yamamoto Ribeiro MM, Mossini SA, Bando E, Bomfim Nda S, et al. Antifungal properties and inhibitory effects upon aflatoxin production of *Thymus vulgaris* L. by *Aspergillus flavus* Link. Food Chemistry 2015; **173**:1006-10.
- [8] Khaledi N, Taheri P, Tarighi S. Antifungal activity of various essential oils against *Rhizoctonia solani* and *Macrophomina phaseolina* as major bean pathogens. Journal of Applied Microbiology 2015; **118**:704-17.
- [9] Aazza S, Lyoussi B, Megías C, Cortés-Giraldo I, Vioque J, Figueiredo AC, et al. Anti-oxidant, anti-inflammatory and anti-proliferative activities of Moroccan commercial essential oils. Natural Product Communications 2014; **9**:587-94.
- [10] Al-Menhali A, Al-Rumaihi A, Al-Mohammed H, Al-Mazrooey H, Al-Shamlan M, AlJassim M, et al. *Thymus vulgaris* (Thyme) inhibits proliferation, adhesion, migration, and invasion of human colorectal cancer cells. Journal of Medicinal Food 2015; **18**:54-9.
- [11] Alamgeer, Akhtar MS, Jabeen Q, Khan HU, Maheen S, Haroon-Ur-Rash, et al. Pharmacological evaluation of antihypertensive effect of aerial parts of *Thymus linearis* benth. Acta Poloniae Pharmaceutica 2014; **71**:677-82.

- [12] Esmaeili-Mahani S, Falahi F, Yaghoobi MM. Proapoptotic and antiproliferative effects of *Thymus caramanicus* on human breast cancer cell line (MCF-7) and its interaction with anticancer drug vincristine. Evidence-based Complementary and Alternative Medicine 2014; **2014**:893247
- [13] Giarratana F, Muscolino D, Beninati C, Giuffrida A, Panebianco A. Activity of *Thymus vulgaris* essential oil against *Anisakis* larvae. Experimental Parasitology 2014;142:7-10.
- [14] Ammons MC, Tripet BP, Carlson RP, Kirker KR, Gross MA, Stanisich JJ, et al. Quantitative NMR metabolite profiling of methicillin-resistant and methicillin-susceptible *Staphylococcus aureus* discriminates between biofilm and planktonic phenotypes. Journal of Proteome Research 2014; **13**:2973-85.
- [15] Sun M, Kang Q, Li T, Huang L, Jiang Y, Xia W. Effect of high-fructose corn syrup on *Streptococcus mutans* virulence gene expression and on tooth demineralization. European Journal of Oral Sciences 2014; **122**:216-22.
- [16] Ramage G, Mowat E, Jones B, Williams C, Lopez-Ribot J. Our current understanding of fungal biofilms. Critical Reviews in Microbiology 2009; **35**:340-55.

- [17] Cuesta AI, Jewtuchowicz V, Brusca MI, Nastro ML, Rosa AC. Prevalence of *Staphylococcus* spp and *Candida* spp in the oral cavity and periodontal pockets of periodontal disease patients. Acta Odontológica Latinoamericana 2010; **23**:20-6.
- [18] Zuanazzi D, Souto R, Mattos MB, Zuanazzi MR, Tura BR, Sansone C, et al. Prevalence of potential bacterial respiratory pathogens in the oral cavity of hospitalised individuals. Archives of Oral Biology 2010; **55**:21-8.
- [19] Atila-Pektas B, Yurdakul P, Gulmez D, Gordus O. Antimicrobial effects of root canal medicaments against *Enterococcus faecalis* and *Streptococcus mutans*. International Endodontic Journal 2013; **46**:413-8.
- [20] da Silva-Boghossian CM, do Souto RM, Luiz RR, Colombo AP. Association of red complex, *A. actinomycetemcomitans* and non-oral bacteria with periodontal diseases. Archives of Oral Biology 2011; **56**:899-906.
- [21] Harriott MM, Noverr MC. *Candida albicans* and *Staphylococcus aureus* form polymicrobial biofilms: effects on antimicrobial resistance. Antimicrobial Agents and Chemotherapy 2009; **53**:3914-22.
- [22] Mason KL, Erb Downward JR, Falkowski NR, Young VB, Kao JY, Huffnagle GB. Interplay between the gastric bacterial microbiota and *Candida albicans* during postantibiotic recolonization and gastritis. Infection and Immunity 2012; **80**:150-8.

- [23] Pereira-Cenci T, Deng DM, Kraneveld EA, Manders EM, Del Bel Cury AA, ten Cate JM, et al. The effect of *Streptococcus mutans* and *Candida glabrata* on *Candida albicans* biofilms formed on different surfaces. Archives of Oral Biology 2008; **53**:755-64.
- [24] Marchant S, Brailsford SR, Twomey AC, Roberts GJ, Beighton D. The predominant microflora of nursing caries lesions. Caries Research 2001; **35**:397-406.
- [25] de Carvalho FG, Silva DS, Hebling J, Spolidorio LC, Spolidorio DM. Presence of mutans streptococci and *Candida* spp. in dental plaque/dentine of carious teeth and early childhood caries. Archives of Oral Biology 2006; **51**:1024-8.
- [26] Klinker T, Guggenheim B, Klimm W, Thurnheer T. Dental caries in rats associated with *Candida albicans*. Caries Research 2011; **45**:100-6.
- [27] Chotirmall SH, O'Donoghue E, Bennett K, Gunaratnam C, O'Neill SJ, McElvaney NG. Sputum *Candida albicans* presages FEV₁ decline and hospital-treated exacerbations in cystic fibrosis. Chest 2010; **138**:1186-95.
- [28] Lee AV, Oesterreich S, Davidson NE. MCF-7 cells--changing the course of breast cancer research and care for 45 years. Journal of the National Cancer Institute 2015; **107**.
- [29] Rahbari R, Sheahan T, Modes V, Collier P, Macfarlane C, Badge RM. A novel L1 retrotransposon marker for HeLa cell line identification. Bio Techniques 2009; **46**:277-84.

- [30] Kars MD, Iseri OD, Gündüz U, Ural AU, Arpaci F, Molnár J. Development of rational *in vitro* models for drug resistance in breast cancer and modulation of MDR by selected compounds. *Anticancer Research* 2006; **26**:4559-68.
- [31] 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 Complementary and Alternative Medicine* 2013; **13**:208.
- [32] 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). *Archives of Oral Biology* 2014; **59**:808-14.
- [33] Silva AM, Machado ID, Santin JR, de Melo IL, Pedrosa GV, Genovese MI, et al. Aqueous extract of *Rosmarinus officinalis* L. inhibits neutrophil influx and cytokine secretion. *Phytotherapy Research* 2015; **29**:125-33.
- [34] Undeğer U, Başaran A, Degen GH, Başaran N. Antioxidant activities of major thyme ingredients and lack of (oxidative) DNA damage in V79 Chinese hamster lung fibroblast cells at low levels of carvacrol and thymol. *Food and Chemical Toxicology*. 2009; **47**:2037-43.

- [35] Buyukleyla M, Rencuzogullari E. The effects of thymol on sister chromatid exchange, chromosome aberration and micronucleus in human lymphocytes. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 2009; **72**:943-7.
- [36] CLSI. Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically. Approved standard, CLSI document M7-A6. 6th ed. USA: CLSI; 2003.
- [37] CLSI. Reference method for broth dilution in tests for determining the sensitivity to antifungal therapy of yeast. Approved standard, CLSI document M27-A2. 2nd ed. USA: CLSI; 2002.
- [38] CLSI. Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of yeasts. Fourth Informational Supplement M27-S4. USA: CLSI; 2012.
- [39] Khan MS, Ahmad I, Cameotra SS, Botha F. Sub-MICs of *Carum copticum* and *Thymus vulgaris* influence virulence factors and biofilm formation in *Candida* spp. *BMC Complementary and Alternative Medicine* 2014; **14**:337.
- [40] Kavanaugh NL, Ribbeck K. Selected antimicrobial essential oils eradicate *Pseudomonas* spp. and *Staphylococcus aureus* biofilms. *Applied and Environmental Microbiology* 2012; **78**:4057-61.
- [41] Hammad M, Sallal AK, Darmani H. Inhibition of *Streptococcus mutans* adhesion to buccal epithelial cells by an aqueous extract of *Thymus vulgaris*. *International Journal of Dental Hygiene* 2007; **5**:232-5.

- [42] Melo AD, Amaral AF, Schaefer G, Luciano FB, de Andrade C, Costa LB, et al. Antimicrobial effect against different bacterial strains and bacterial adaptation to essential oils used as feed additives. *Canadian Journal of Veterinary Research* 2015;**79**:285-9.
- [43] Silva N, Alves S, Gonçalves A, Amaral JS, Poeta P. Antimicrobial activity of essential oils from Mediterranean aromatic plants against several foodborne and spoilage bacteria. *Food Science and Technology International* 2013; **19**:503-10.
- [44] Mastropaolo MD, Evans NP, Byrnes MK, Stevens AM, Robertson JL, Melville SB. Synergy in polymicrobial infections in a mouse model of type 2 diabetes. *Infection and Immunity*. 2005; **73**:6055-63.
- [45] O'Connell HA, Kottkamp GS, Eppelbaum JL, Stubblefield BA, Gilbert SE, Gilbert ES. Influences of biofilm structure and antibiotic resistance mechanisms on indirect pathogenicity in a model polymicrobial biofilm. *Applied and Environmental Microbiology* 2006; **72**:5013-9.
- [46] Morales DK, Grahl N, Okegbe C, Dietrich LE, Jacobs NJ, Hogan DA. Control of *Candida albicans* metabolism and biofilm formation by *Pseudomonas aeruginosa* phenazines. *mBio* 2013; **4**:e00526-12.
- [47] Luzio JP, Pryor PR, Bright NA. Lysosomes: fusion and function. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 2007; **8**:622-32.
- [48] Duncan R, Richardson SC. Endocytosis and intracellular trafficking as gateways for nanomedicine delivery: opportunities and challenges. *Molecular Pharmaceutics*. 2012; **9**:2380-402.

- [49] Ding Z, Yang X, Pater A, Tang SC. Resistance to apoptosis is correlated with the reduced caspase-3 activation and enhanced expression of antiapoptotic proteins in human cervical multidrug-resistant cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 2000; **270**:415-20.
- [50] Esmailbeig M, Kouhpayeh SA, Amirghofran Z. An investigation of the growth inhibitory capacity of several medicinal plants from Iran on tumor cell lines. *Iranian Journal of Cancer Prevention* 2015; **8**:e4032.
- [51] Berrington D, Lall N. Anticancer activity of certain herbs and spices on the cervical epithelial carcinoma (HeLa) cell line. *Evidence-based Complementary and Alternative Medicine* 2012; **2012**:564927.
- [52] Ocaña A, Reglero G. Effects of thyme extract oils (from *Thymus vulgaris*, *Thymus zygis*, and *Thymus hyemalis*) on cytokine production and gene expression of oxLDL-stimulated thp-1-macrophages. *Journal of Obesity* 2012; **2012**:104706.
- [53] Tsai ML, Lin CC, Lin WC, Yang CH. Antimicrobial, antioxidant, and anti-inflammatory activities of essential oils from five selected herbs. *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry* 2011; **75**:1977-83.
- [54] Calò R, Visone CM, Marabini L. Thymol and *Thymus vulgaris* L. activity against UVA- and UVB-induced damage in NCTC 2544 cell line. *Mutation Research Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis* 2015; **791**:30-7.

5 ANÁLISE DOS ARTIGOS

Nos artigos elaborados foi possível constatar alguns efeitos biológicos dos extratos vegetais de *R. officinalis* L. e *T. vulgaris* L. Ambos foram capazes de reduzir significativamente biofilmes mono e polimicrobianos, apenas com exposição de 5 min. Este tempo foi escolhido levando em consideração estudos anteriores realizados e publicados por nosso grupo de pesquisa, onde constatamos efetividade no controle de biofilmes. Também foi levado em consideração as aplicações futuras que estes produtos possam ter, como em produtos odontológicos, como dentifrícios, enxaguantes bucais, irrigadores de canais e formulações tópicas.

Ficou demonstrado também que algumas concentrações dos extratos não afetaram significativamente a viabilidade celular das linhagens, o que poderia viabilizar sua utilização em produtos de uso odontológico citados anteriormente. Além do mais, não foram mutagênicas, uma vez que, a formação de micronúcleos foi semelhante ou inferior ao apresentado pelo grupo não exposto aos extratos.

Outra atividade biológica constatada nos estudos foi o efeito imunomodulador dos extratos, uma vez que, foi verificado que as concentrações destes produtos inibiram a produção de citocinas pró-inflamatórias. Com isso, a aplicabilidade destes produtos em formulações anti-inflamatórias poderia ser pensada. Contudo, estudos *in vivo* e clínicos devem ser conduzidos no futuro, para se ter garantia da viabilidade de tais produtos.

Nossos resultados foram obtidos com experimentação *in vitro*. Por isso, estes outros estágios da pesquisa científica, devem ser realizados futuramente, para podermos um dia elaborarmos em

laboratório aquelas formulações odontológicas. Por outro lado, nossos resultados concordaram com inúmeros estudos *in vitro* já realizados com os mesmos extratos vegetais, sobre alguns micro-organismos e linhagens celulares. Com isso, os resultados atuais alcançam um nível mais fundamental, porém os resultados obtidos são promissores, podendo partir de um ponto mais seguro, uma vez que, a etapa inicial de uma complexa investigação científica tenha sido finalizada.

Acreditamos que antes mesmo do início de testes *in vivo* ou clínicos seria necessário algumas intervenções. Por isso, algumas perspectivas poderiam estar relacionadas à ampliação do teste antimicrobiano destes vegetais sobre outros micro-organismos, bem como, outras interações microbianas em biofilmes, expandindo para espécies de interesse, não somente odontológica, como médico e clínico; à verificação de atividade citotóxica e genotóxica para outras linhagens não tumorais e tumorais, correlacionadas com neoplasias da cavidade oral e as mais comuns encontradas em outros sistemas do corpo humano; e à investigação da imunomodulação de outras citocinas pró e anti-inflamatórias, bem como, outros mediadores ligados à inflamação.

O pensamento cético sobre as propriedades medicinais de algumas plantas pode ser rompido quando podemos comprovar cientificamente sua existência. Resultados obtidos em diferentes grupos de pesquisa, porém que convergem em um único sentido, que se complementam, que são homogêneos entre si, podem colaborar positivamente para mudanças de hábitos, seja no âmbito industrial, onde será elaborado, manipulado e produzido estes produtos, no âmbito acadêmico, responsável pela investigação científica, porém sem produção em larga escala, ou no âmbito comunitário, onde os produtos chegarão e serão consumidos.

6 REFERÊNCIAS*

Aazza S, Lyoussi B, Megías C, Cortés-Giraldo I, Vioque J, Figueiredo AC, et al. Anti-oxidant, anti-inflammatory and anti-proliferative activities of Moroccan commercial essential oils. *Nat Prod Commun.* 2014;9(4):587-94.

Abuzeid N, Kalsum S, Koshy RJ, Larsson M, Glader M, Andersson H, et al. Antimycobacterial activity of selected medicinal plants traditionally used in Sudan to treat infectious diseases. *J Ethnopharmacol.* 2014;157:134-9. doi: 10.1016/j.jep.2014.09.020.

Ahmed SB, Sghaier RM, Guesmi F, Kaabi B, Mejri M, Attia H, et al. Evaluation of antileishmanial, cytotoxic and antioxidant activities of essential oils extracted from plants issued from the leishmaniasis-endemic region of Sned (Tunisia). *Nat Prod Res.* 2011;25(12):1195-201. doi: 10.1080/14786419.2010.534097.

Alamgeer, Akhtar MS, Jabeen Q, Khan HU, Maheen S, Haroon-Ur-Rash, et al. Pharmacological evaluation of antihypertensive effect of aerial parts of *Thymus linearis* benth. *Acta Pol Pharm.* 2014;71(4):677-82.

Al Laham SA, Al Fadel FM. Antibacterial activity of various plants extracts against antibiotic-resistant *Aeromonas hydrophila*. *Jundishapur J Microbiol.* 2014;7(7):e11370. doi: 10.5812/jjm.11370.

Al-Menhali A, Al-Rumaihi A, Al-Mohammed H, Al-Mazrooey H, Al-Shamlan M, AlJassim M, et al. *Thymus vulgaris* (Thyme) inhibits proliferation, adhesion, migration, and invasion of human colorectal cancer cells. *J Med Food.* 2015;18(1):54-9. doi: 10.1089/jmf.2013.3121.

Ammons MC, Triplet BP, Carlson RP, Kirker KR, Gross MA, Stanisich JJ, et al. Quantitative NMR metabolite profiling of methicillin-resistant and methicillin-susceptible *Staphylococcus aureus* discriminates between biofilm and planktonic phenotypes. *J Proteome Res.* 2014;13(6):2973-85. doi: 10.1021/pr500120c.

* 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

Ayesh BM, Abed AA, Faris DM. *In vitro* inhibition of human leukemia THP-1 cells by *Origanum syriacum* L. and *Thymus vulgaris* L. extracts. BMC Res Notes. 2014;7:612. doi: 10.1186/1756-0500-7-612.

Baena-Monroy T, Moreno-Maldonado V, Franco-Martínez F, Aldape-Barrios B, Quindós G, Sánchez-Vargas LO. *Candida albicans*, *Staphylococcus aureus* and *Streptococcus mutans* colonization in patients wearing dental prosthesis. Med Oral Patol Oral Cir Bucal. 2005;10(1):E27-39.

Baraquet C, Harwood CS. Cyclic diguanosine monophosphate represses bacterial flagella synthesis by interacting with the Walker A motif of the enhancer-binding protein FleQ. Proc Natl Acad Sci U S A. 2013;110:18478–18483. doi: 10.1073/pnas.1318972110.

Belaqziz R, Bahri F, Romane A, Antoniotti S, Fernandez X, Duñach E. Essential oil composition and antibacterial activity of the different parts of *Thymus maroccanus* Ball: an endemic species in Morocco. Nat Prod Res. 2013;27(18):1700-4. doi: 10.1080/14786419.2013.768989.

Bowen WH, Koo H. Biology of *Streptococcus mutans*-derived glucosyltransferases: role in extracellular matrix formation of cariogenic biofilms. Caries Res. 2011;45(1):69-86. doi: 10.1159/000324598.

Buyukleyla M, Rencuzogullari E. The effects of thymol on sister chromatid exchange, chromosome aberration and micronucleus in human lymphocytes. Ecotoxicol Environ Saf. 2009;72(3):943-7. doi: 10.1016/j.ecoenv.2008.10.005.

Cassat JE, Smeltzer MS, Lee CY. Investigation of biofilm formation in clinical isolates of *Staphylococcus aureus*. Methods Mol Biol. 2014;1085:195-211. doi: 10.1007/978-1-62703-664-1_12.

Chandra J, Kuhn DM, Mukherjee PK, Hoyer LL, McCormick T, Ghannoum MA. Biofilm formation by the fungal pathogen *Candida albicans*: development, architecture, and drug resistance. J Bacteriol. 2001;183(18):5385-94.

Chen AI, Dolben EF, Okegbe C, Harty CE, Golub Y, Thao S, et al. *Candida albicans* ethanol stimulates *Pseudomonas aeruginosa* WspR-controlled biofilm formation as part of a cyclic relationship involving phenazines. PLoS Pathog. 2014;10(10):e1004480. doi: 10.1371/journal.ppat.1004480.

Chifiriuc C, Grumezescu V, Grumezescu AM, Saviuc C, Lazăr V, Andronescu E. Hybrid magnetite nanoparticles/*Rosmarinus officinalis* essential oil nanobiosystem with antibiofilm activity. *Nanoscale Res Lett.* 2012;7:209. doi: 10.1186/1556-276X-7-209.

Chotirmall SH, O'Donoghue E, Bennett K, Gunaratnam C, O'Neill SJ, McElvaney NG. Sputum *Candida albicans* presages FEV₁ decline and hospital-treated exacerbations in cystic fibrosis. *Chest.* 2010;138(5):1186-95. doi: 10.1378/chest.09-2996.

CLSI. Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically. Approved standard, NCCLS document M7-A6. 6th ed. USA: NCCLS; 2003.

CLSI. Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of yeasts. Fourth Informational Supplement M27-S4. USA: CLSI; 2012.

CLSI. Reference method for broth dilution in tests for determining the sensitivity to antifungal therapy of yeast. Approved standard, NCCLS document M27-A2. 2nd ed. USA: NCCLS; 2002.

Cruz MR, Graham CE, Gagliano BC, Lorenz MC, Garsin DA. *Enterococcus faecalis* inhibits hyphal morphogenesis and virulence of *Candida albicans*. *Infect Immun.* 2013;81(1):189-200. doi: 10.1128/IAI.00914-12.

Davey ME, O'toole GA. Microbial biofilms: from ecology to molecular genetics. *Microbiol Mol Biol Rev.* 2000;64(4):847-67.

da Silva BN, Nakassugi LP, Faggion POJ, Kohiyama CY, Mossini SA, Grespan R, et al. Antifungal activity and inhibition of fumonisin production by *Rosmarinus officinalis* L. essential oil in *Fusarium verticillioides* (Sacc.) Nirenberg. *Food Chem.* 2015;166:330-6. doi: 10.1016/j.foodchem.2014.06.019.

da Silva-Boghossian CM, do Souto RM, Luiz RR, Colombo AP. Association of red complex, *A. actinomycetemcomitans* and non-oral bacteria with periodontal diseases. *Arch Oral Biol.* 2011;56(9):899-906. doi: 10.1016/j.archoralbio.2011.02.009.

Delhaes L, Monchy S, Fréalle E, Hubans C, Salleron J, Leroy S, et al. The airway microbiota in cystic fibrosis: a complex fungal and bacterial community--implications for therapeutic management. *PLoS One.* 2012;7(4):e36313. doi: 10.1371/journal.pone.0036313.

Denning GM, Iyer SS, Reszka KJ, O'Malley Y, Rasmussen GT, Britigan BE. Phenazine-1-carboxylic acid, a secondary metabolite of *Pseudomonas aeruginosa*, alters expression of immunomodulatory proteins by human airway epithelial cells. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*. 2003;285(3):L584-92.

de Carvalho FG, Silva DS, Hebling J, Spolidorio LC, Spolidorio DM. Presence of mutans streptococci and *Candida* spp. in dental plaque/dentine of carious teeth and early childhood caries. *Arch Oral Biol*. 2006;51(11):1024-8.

de Las Mercedes OM, Carezzano ME, Giuliano M, Daghero J, Zygadlo J, et al. Antimicrobial activity of essential oils of *Thymus vulgaris* and *Oreganum vulgare* on phytopathogenic strains isolated from soybean. *Plant Biol (Stuttg)*. 2015;17(3):758-65. doi: 10.1111/plb.12282

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;59(8):808-14. doi: 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;13:208. doi: 10.1186/1472-6882-13-208.

Dias LS, Menis ME, Jorge N. Effect of rosemary (*Rosmarinus officinalis*) extracts on the oxidative stability and sensory acceptability of soybean oil. *J Sci Food Agric*. 2015;95(10):2021-7. doi: 10.1002/jsfa.6914.

El-Demerdash FM, Abbady EA, Baghdadi HH. Oxidative stress modulation by *Rosmarinus officinalis* in creosote-induced hepatotoxicity. *Environ Toxicol*. 2016;31(1):85-92. doi: 10.1002/tox.22024.

Elejalde Guerra JI. Oxidative stress, diseases and antioxidant treatment. *An Med Interna*. 2001;18(6):326-35.

Esmaeili-Mahani S, Falahi F, Yaghoobi MM. Proapoptotic and antiproliferative effects of *Thymus caramanicus* on human breast cancer cell line (MCF-7) and its interaction with anticancer drug vincristine. *Evid Based Complement Alternat Med*. 2014;2014:893247. doi: 10.1155/2014/893247.

Falodun A, Imieje V, Erharuyi O, Ahomafor J, Jacob MR, Khan SI, et al. Evaluation of three medicinal plant extracts against *Plasmodium falciparum* and selected microorganisms. *Afr J Tradit Complement Altern Med*. 2014;11(4):142-6.

Felicidade I, Lima JD, Pesarini JR, Monreal AC, Mantovani MS, Ribeiro LR, et al. Mutagenic and antimutagenic effects of aqueous extract of rosemary (*Rosmarinus officinalis* L.) on meristematic cells of *Allium cepa*. *Genet Mol Res*. 2014;13(4):9986-96. doi: 10.4238/2014.November.28.3.

Formagio AS, Vieira MC, Volobuff CR, Silva MS, Matos AI, Cardoso CA, et al. *In vitro* biological screening of the anticholinesterase and antiproliferative activities of medicinal plants belonging to Annonaceae. *Braz J Med Biol Res*. 2015;13. doi: 10.1590/1414-431X20144127.

Fratini F, Casella S, Leonardi M, Pisseri F, Ebani VV, Pistelli L, et al. Antibacterial activity of essential oils, their blends and mixtures of their main constituents against some strains supporting livestock mastitis. *Fitoterapia*. 2014;96:1-7. doi: 10.1016/j.fitote.2014.04.003.

Furtado RA, de Araújo FR, Resende FA, Cunha WR, Tavares DC. Protective effect of rosmarinic acid on V79 cells evaluated by the micronucleus and comet assays. *J Appl Toxicol*. 2010;30(3):254-9. doi: 10.1002/jat.1491.

Galasso S, Pacifico S, Kretschmer N, Pan SP, Marciano S, Piccolella S, et al. Influence of seasonal variation on *Thymus longicaulis* C. Presl chemical composition and its antioxidant and anti-inflammatory properties. *Phytochemistry*. 2014;107:80-90. doi: 10.1016/j.phytochem.2014.08.015.

Gauch LM, Silveira-Gomes F, Esteves RA, Pedrosa SS, Gurgel ES, Arruda AC, et al. Effects of *Rosmarinus officinalis* essential oil on germ tube formation by *Candida albicans* isolated from denture wearers. *Rev Soc Bras Med Trop*. 2014;47(3):389-91.

Giarratana F, Muscolino D, Beninati C, Giuffrida A, Panebianco A. Activity of *Thymus vulgaris* essential oil against *Anisakis larvae*. *Exp Parasitol*. 2014;142:7-10. doi: 10.1016/j.exppara.2014.03.028.

Gregoire S, Xiao J, Silva BB, Gonzalez I, Agidi PS, Klein MI, et al. Role of glucosyltransferase B in interactions of *Candida albicans* with *Streptococcus mutans* and with an experimental pellicle on hydroxyapatite surfaces. *Appl Environ Microbiol*. 2011;77(18):6357-67. doi: 10.1128/AEM.05203-11.

González-Vallinas M, Molina S, Vicente G, Zarza V, Martín-Hernández R, García-Risco MR, et al. Expression of microRNA-15b and the glycosyltransferase GCNT3 correlates with antitumor efficacy of Rosemary diterpenes in colon and pancreatic cancer. *PLoS One*. 2014;9(6):e98556. doi: 10.1371/journal.pone.0098556.

Guerra-Boone L, Alvarez-Román R, Alvarez-Román R, Salazar-Aranda R, Torres-Cirio A, Rivas-Galindo VM, et al. Antimicrobial and antioxidant activities and chemical characterization of essential oils of *Thymus vulgaris*, *Rosmarinus officinalis* and *Origanum majorana* from northeastern México. *Pak J Pharm Sci*. 2015;28(1):363-9.

Harriott MM, Noverr MC. *Candida albicans* and *Staphylococcus aureus* form polymicrobial biofilms: effects on antimicrobial resistance. *Antimicrob Agents Chemother*. 2009;53(9):3914-22. doi: 10.1128/AAC.00657-09.

Horvathova E, Navarova J, Galova E, Sevcovicova A, Chodakova L, Snahnicanova Z, et al. Assessment of antioxidative, chelating, and DNA-protective effects of selected essential oil components (eugenol, carvacrol, thymol, borneol, eucalyptol) of plants and intact *Rosmarinus officinalis* oil. *J Agric Food Chem*. 2014;62(28):6632-9. doi: 10.1021/jf501006y.

Irshaid FI, Tarawneh KA, Jacob JH, Alshdefat AM. Phenol content, antioxidant capacity and antibacterial activity of methanolic extracts derived from four Jordanian medicinal plants. *Pak J Biol Sci*. 2014;17(3):372-9.

Ismaili H, Milella L, Fkih-Tetouani S, Ildrissi A, Camporese A, Sosa S, et al. *In vivo* topical anti-inflammatory and *in vitro* antioxidant activities of two extracts of *Thymus satureioides* leaves. *J Ethnopharmacol*. 2004;91(1):31-6.

Jamali CA, El Bouzidi L, Bekkouche K, Lahcen H, Markouk M, Wohlmuth H, et al. Chemical composition and antioxidant and anticandidal activities of essential oils from different wild Moroccan *Thymus* species. *Chem Biodivers*. 2012;9(6):1188-97. doi: 10.1002/cbdv.201200041.

Jeong S, Lee S, Choi WJ, Sohn UD, Kim W. The Effect of polyphenols isolated from *Cynanchi wilfordii* radix with anti-inflammatory, antioxidant, and anti-bacterial activity. *Korean J Physiol Pharmacol*. 2015;19(2):151-8. doi: 10.4196/kjpp.2015.19.2.151.

Kanasi E, Dewhirst FE, Chalmers NI, Kent R Jr, Moore A, Hughes CV, et al. Clonal analysis of the microbiota of severe early childhood caries. *Caries Res*. 2010;44(5):485-97. doi: 10.1159/000320158.

Katneni R, Hedayati SS. Central venous catheter-related bacteremia in chronic hemodialysis patients: epidemiology and evidence-based management. *Nat Clin Pract Nephrol*. 2007;3(5):256-66.

Kawanishi S, Hiraku Y, Murata M, Oikawa S. The role of metals in site-specific DNA damage with reference to carcinogenesis. *Free Radic Biol Med*. 2002;32(9):822-32.

Khaledi N, Taheri P, Tarighi S. Antifungal activity of various essential oils against *Rhizoctonia solani* and *Macrophomina phaseolina* as major bean pathogens. *J Appl Microbiol*. 2015;118(3):704-17. doi: 10.1111/jam.12730.

Khan MS, Ahmad I, Cameotra SS, Botha F. Sub-MICs of *Carum copticum* and *Thymus vulgaris* influence virulence factors and biofilm formation in *Candida* spp. *BMC Complement Altern Med*. 2014;14:337. doi: 10.1186/1472-6882-14-337.

Klinke T, Guggenheim B, Klimm W, Thurnheer T. Dental caries in rats associated with *Candida albicans*. *Caries Res*. 2011;45(2):100-6. doi: 10.1159/000324809.

Klotz SA, Chasin BS, Powell B, Gaur NK, Lipke PN. Polymicrobial bloodstream infections involving *Candida* species: analysis of patients and review of the literature. *Diagn Microbiol Infect Dis*. 2007;59(4):401-6.

Kohiyama CY, Yamamoto Ribeiro MM, Mossini SA, Bando E, Bomfim Nda S, et al. Antifungal properties and inhibitory effects upon aflatoxin production of *Thymus vulgaris* L. by *Aspergillus flavus* Link. *Food Chem*. 2015;173:1006-10. doi: 10.1016/j.foodchem.2014.10.135.

Kojic EM, Darouiche RO. *Candida* infections of medical devices. *Clin Microbiol Rev*. 2004;17(2):255-67.

Kuchma SL, Griffin EF, O'Toole GA. Minor pilins of the type IV pilus system participate in the negative regulation of swarming motility. *J Bacteriol*. 2012;194(19):5388-403. doi: 10.1128/JB.00899-12.

Kunnaja P, Wongpalee SP, Panthong A. Evaluation of anti-inflammatory, analgesic, and antipyretic activities of the ethanol extract from *Murdannia loriformis* (Hassk.) Rolla Rao et Kammathy. *Bioimpacts*. 2014;4(4):183-9. doi: 10.15171/bi.2014.018.

Leclair LW, Hogan DA. Mixed bacterial-fungal infections in the CF respiratory tract. *Med Mycol*. 2010;48(1):S125-32. doi: 10.3109/13693786.2010.521522.

Li JL, Ng LG. Peeking into the secret life of neutrophils. *Immunol Res.* 2012;53(1-3):168-81. doi: 10.1007/s12026-012-8292-8.

Li XL, Liu JX, Li P, Zheng YQ. Protective effect of rosmarinic acid on hypoxia/reoxygenation injury in cardiomyocytes. *Zhongguo Zhong Yao Za Zhi.* 2014;39(10):1897-901.

Lin CY, Chen JH, Fu RH, Tsai CW. Induction of Pi form of glutathione S-transferase by carnosic acid is mediated through PI3K/Akt/NF- κ B pathway and protects against neurotoxicity. *Chem Res Toxicol.* 2014;27(11):1958-66. doi: 10.1021/tx5003063.

Mah TF, O'Toole GA. Mechanisms of biofilm resistance to antimicrobial agents. *Trends Microbiol.* 2001;9(1):34-9.

Maissa BJ, Walid H. Antifungal activity of chemically different essential oils from wild Tunisian *Thymus* spp. *Nat Prod Res.* 2015;29(9):869-73. doi: 10.1080/14786419.2014.984182.

Manke A, Wang L, Rojanasakul Y. Mechanisms of nanoparticle-induced oxidative stress and toxicity. *Biomed Res Int.* 2013;2013:942916. doi: 10.1155/2013/942916.

Marchant S, Brailsford SR, Twomey AC, Roberts GJ, Beighton D. The predominant microflora of nursing caries lesions. *Caries Res.* 2001;35(6):397-406.

Mason KL, Erb Downward JR, Falkowski NR, Young VB, Kao JY, Huffnagle GB. Interplay between the gastric bacterial microbiota and *Candida albicans* during postantibiotic recolonization and gastritis. *Infect Immun.* 2012;80(1):150-8. doi: 10.1128/IAI.05162-11.

Mastropaolo MD, Evans NP, Byrnes MK, Stevens AM, Robertson JL, Melville SB. Synergy in polymicrobial infections in a mouse model of type 2 diabetes. *Infect Immun.* 2005;73(9):6055-63.

Metuge JA, Nyongbela KD, Mbah JA, Samje M, Fotso G, Babiaka SB, et al. Anti-Onchocerca activity and phytochemical analysis of an essential oil from *Cyperus articulatus* L. *BMC Complement Altern Med.* 2014;14:223. doi: 10.1186/1472-6882-14-223.

Morales DK, Grahl N, Okegbe C, Dietrich LE, Jacobs NJ, Hogan DA. Control of *Candida albicans* metabolism and biofilm formation by *Pseudomonas aeruginosa* phenazines. *MBio.* 2013;4(1):e00526-12. doi: 10.1128/mBio.00526-12.

Morales DK, Hogan DA. *Candida albicans* interactions with bacteria in the context of human health and disease. PLoS Pathog. 2010a;6(4):e1000886. doi: 10.1371/journal.ppat.1000886.

Morales DK, Jacobs NJ, Rajamani S, Krishnamurthy M, Cubillos-Ruiz JR, Hogan DA. Antifungal mechanisms by which a novel *Pseudomonas aeruginosa* phenazine toxin kills *Candida albicans* in biofilms. Mol Microbiol. 2010b;78(6):1379-92. doi: 10.1111/j.1365-2958.2010.07414.x.

Motlagh MK, Sharafi M, Zhandi M, Mohammadi-Sangcheshmeh A, Shakeri M, Soleimani M, et al. Antioxidant effect of rosemary (*Rosmarinus officinalis* L.) extract in soybean lecithin-based semen extender following freeze-thawing process of ram sperm. Cryobiology. 2014;69(2):217-22. doi: 10.1016/j.cryobiol.2014.07.007.

Munari CC, de Oliveira PF, Leandro LF, Pimenta LM, Ferreira NH, da Costa Jde, et al. *In vivo* assessment of genotoxic, antigenotoxic and anticarcinogenic activities of *Solanum lycocarpum* fruits glycoalkaloidic extract. PLoS One. 2014;9(11):e111999. 10.1371/journal.pone.0111999.

Ocaña A, Reglero G. Effects of thyme extract oils (from *Thymus vulgaris*, *Thymus zygis*, and *Thymus hyemalis*) on cytokine production and gene expression of oxLDL-stimulated THP-1-macrophages. J Obes. 2012;2012:104706. doi: 10.1155/2012/104706.

Östling O, Johanson KJ. Microelectrophoretic study of radiation-induced DNA damages in individual mammalian cells. Biochem Biophys Res Commun. 1984;123(1):291-8.

O'Connell HA, Kottkamp GS, Eppelbaum JL, Stubblefield BA, Gilbert SE, Gilbert ES. Influences of biofilm structure and antibiotic resistance mechanisms on indirect pathogenicity in a model polymicrobial biofilm. Appl Environ Microbiol. 2006;72(7):5013-9.

Parisotto TM, Steiner-Oliveira C, Silva CM, Rodrigues LK, Nobre-dos-Santos M. Early childhood caries and mutans streptococci: a systematic review. Oral Health Prev Dent. 2010;8(1):59-70.

Peleg AY, Hogan DA, Mylonakis E. Medically important bacterial-fungal interactions. Nat Rev Microbiol. 2010;8(5):340-9. doi: 10.1038/nrmicro2313.

Pereira-Cenci T, Deng DM, Kraneveld EA, Manders EM, Del Bel Cury AA, ten Cate JM, et al. The effect of *Streptococcus mutans* and *Candida glabrata* on *Candida albicans* biofilms formed on different surfaces. Arch Oral Biol. 2008;53(8):755-64. doi: 10.1016/j.archoralbio.2008.02.015.

Petiwala SM, Berhe S, Li G, Puthenveetil AG, Rahman O, Nonn L, et al. Rosemary (*Rosmarinus officinalis*) extract modulates CHOP/GADD153 to promote androgen receptor degradation and decreases xenograft tumor growth. PLoS One. 2014;9(3):e89772. doi: 10.1371/journal.pone.0089772.

Petrolini FV, Lucarini R, de Souza MG, Pires RH, Cunha WR, Martins CH. Evaluation of the antibacterial potential of *Petroselinum crispum* and *Rosmarinus officinalis* against bacteria that cause urinary tract infections. Braz J Microbiol. 2013;44(3):829-34. doi: 10.1590/S1517-83822013005000061.

Quivey RG Jr, Kuhnert WL, Hahn K. Adaptation of oral streptococci to low pH. Adv Microb Physiol. 2000;42:239-74.

Rada B, Leto TL. Pyocyanin effects on respiratory epithelium: relevance in *Pseudomonas aeruginosa* airway infections. Trends Microbiol. 2013;21(2):73-81. doi: 10.1016/j.tim.2012.10.004.

Raghavendran K, Mylotte JM, Scannapieco FA. Nursing home-associated pneumonia, hospital-acquired pneumonia and ventilator-associated pneumonia: the contribution of dental biofilms and periodontal inflammation. Periodontol 2000. 2007;44:164-77.

Raja M, Hannan A, Ali K. Association of oral candidal carriage with dental caries in children. Caries Res. 2010;44(3):272-6. doi: 10.1159/000314675.

Rašković A, Milanović I, Pavlović N, Čebović T, Vukmirović S, Mikov M. Antioxidant activity of rosemary (*Rosmarinus officinalis* L.) essential oil and its hepatoprotective potential. BMC Complement Altern Med. 2014;14:225. doi: 10.1186/1472-6882-14-225.

Razavi-Azarkhiavi K, Behravan J, Mosaffa F, Sehatbakhsh S, Shirani K, Karimi G. Protective effects of aqueous and ethanol extracts of rosemary on H₂O₂-induced oxidative DNA damage in human lymphocytes by comet assay. J Complement Integr Med. 2014;11(1):27-33. doi: 10.1515/jcim-2013-0063.

Rezatofighi SE, Seydabadi A, Seyyed Nejad SM. Evaluating the efficacy of *Achillea millefolium* and *Thymus vulgaris* extracts against Newcastle Disease Virus *in ovo*. Jundishapur J Microbiol. 2014;7(2):e9016. doi: 10.5812/jjm.9016.

Rocha J, Eduardo-Figueira M, Barateiro A, Fernandes A, Brites D, Bronze R, et al. Anti-inflammatory effect of rosmarinic acid and an extract of *Rosmarinus officinalis* in rat models of local and systemic inflammation. *Basic Clin Pharmacol Toxicol*. 2015;116(5):398-413. doi: 10.1111/bcpt.12335. doi: 10.1111/bcpt.12335.

Ruiz-Montañez G, Burgos-Hernández A, Calderón-Santoyo M, López-Saiz CM, Velázquez-Contreras CA, Navarro-Ocaña A, et al. Screening antimutagenic and antiproliferative properties of extracts isolated from jackfruit pulp (*Artocarpus heterophyllus* Lam). *Food Chem*. 2015;175:409-16. doi: 10.1016/j.foodchem.2014.11.122.

Sánchez G, Aznar R. Evaluation of natural compounds of plant origin for inactivation of enteric viruses. *Food Environ Virol*. 2015; 7(2):183-7.

Sanna G, Farci P, Busonera B, Murgia G, La Colla P, Giliberti G. Antiviral properties from plants of the Mediterranean flora. *Nat Prod Res*. 2015;23:1-6. doi: 10.1080/14786419.2014.1003187.

Sebai H, Selmi S, Rtibi K, Gharbi N, Sakly M. Protective effect of *Lavandula stoechas* and *Rosmarinus officinalis* essential oils against reproductive damage and oxidative stress in alloxan-induced diabetic rats. *J Med Food*. 2015;18(2):241-9. doi: 10.1089/jmf.2014.0040.

Shi H, Hudson LG, Liu KJ. Oxidative stress and apoptosis in metal ion-induced carcinogenesis. *Free Radic Biol Med*. 2004;37(5):582-93.

Shin HB, Choi MS, Ryu B, Lee NR, Kim HI, Choi HE, et al. Antiviral activity of carnosic acid against respiratory syncytial virus. *Virol J*. 2013;10:303. doi: 10.1186/1743-422X-10-303.

Sienkiewicz M, Łysakowska M, Ciećwierz J, Denys P, Kowalczyk E. Antibacterial activity of thyme and lavender essential oils. *Med Chem*. 2011;7(6):674-89.

Silva AM, Machado ID, Santin JR, de Melo IL, Pedrosa GV, Genovese MI, et al. Aqueous extract of *Rosmarinus officinalis* L. inhibits neutrophil influx and cytokine secretion. *Phytother Res*. 2015;29(1):125-33. doi: 10.1002/ptr.5238.

Smullen J, Finney M, Storey DM, Foster HA. Prevention of artificial dental plaque formation in vitro by plant extracts. *J Appl Microbiol*. 2012;113(4):964-73. doi: 10.1111/j.1365-2672.2012.05380.x.

Souza GV, Simas AS, Bastos-Pereira AL, Frois GR, Ribas JL, Verdan MH, et al. Antinociceptive activity of the ethanolic extract, fractions, and aggregatin D isolated from *Sinningia aggregata* Tubers. PLoS One. 2015;10(2):e0117501. doi: 10.1371/journal.pone.0117501.

Sun M, Kang Q, Li T, Huang L, Jiang Y, Xia W. Effect of high-fructose corn syrup on *Streptococcus mutans* virulence gene expression and on tooth demineralization. Eur J Oral Sci. 2014;122(3):216-22. doi: 10.1111/eos.12132.

Tsai ML, Lin CC, Lin WC, Yang CH. Antimicrobial, antioxidant, and anti-inflammatory activities of essential oils from five selected herbs. Biosci Biotechnol Biochem. 2011;75(10):1977-83.

ten Cate JM, Klis FM, Pereira-Cenci T, Crielaard W, de Groot PW. Molecular and cellular mechanisms that lead to *Candida* biofilm formation. J Dent Res. 2009;88(2):105-15. doi: 10.1177/0022034508329273.

Undeğer U, Başaran A, Degen GH, Başaran N. Antioxidant activities of major thyme ingredients and lack of (oxidative) DNA damage in V79 Chinese hamster lung fibroblast cells at low levels of carvacrol and thymol. Food Chem Toxicol. 2009;47(8):2037-43. doi: 10.1016/j.fct.2009.05.020.

Vadiakas G. Case definition, aetiology and risk assessment of early childhood caries (ECC): a revisited review. Eur Arch Paediatr Dent. 2008;9(3):114-25.

Wang W, Li N, Luo M, Zu Y, Efferth T. Antibacterial activity and anticancer activity of *Rosmarinus officinalis* L. essential oil compared to that of its main components. Molecules. 2012;17(3):2704-13. doi: 10.3390/molecules17032704.

Wu CR, Tsai CW, Chang SW, Lin CY, Huang LC, Tsai CW. Carnosic acid protects against 6-hydroxydopamine-induced neurotoxicity in *in vivo* and *in vitro* model of Parkinson's disease: Involvement of antioxidative enzymes induction. Chem Biol Interact. 2015;225:40-6. doi: 10.1016/j.cbi.2014.11.011.

Yu MH, Choi JH, Chae IG, Im HG, Yang SA, More K, et al. Suppression of LPS-induced inflammatory activities by *Rosmarinus officinalis* L. Food Chem. 2013;136(2):1047-54. doi: 10.1016/j.foodchem.2012.08.085.