

RESSALVA

Atendendo solicitação do (a) autor (a), o texto completo desta tese será disponibilizado a partir de

05/06/2018



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

LIVIA APARECIDA PROCOPIO GOMES

**AVALIAÇÃO DA BIOCAMPATIBILIDADE E ATIVIDADE
ANTIMICROBIANA *in vitro* DA MATRIZ DE HIDROGEL
ASSOCIADA AO EXTRATO GLICÓLICO DE *Punica granatum* L.
(ROMÃ)**

2017

LIVIA APARECIDA PROCOPIO GOMES

**AVALIAÇÃO DA BIOCAMPATIBILIDADE E ATIVIDADE
ANTIMICROBIANA *in vitro* DA MATRIZ DE HIDROGEL
ASSOCIADA AO EXTRATO GLICÓLICO DO *Punica granatum* L.
(ROMÃ)**

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

Orientadora: Profa. Adj. Samira Esteves Afonso Camargo

São José dos Campos

2017

Instituto de Ciência e Tecnologia [internet]. Normalização de tese e dissertação [acesso em 2018]. Disponível em <http://www.ict.unesp.br/biblioteca/normalizacao>

Apresentação gráfica e normalização de acordo com as normas estabelecidas pelo Serviço de Normalização de Documentos da Seção Técnica de Referência e Atendimento ao Usuário e Documentação (STRAUD).

Gomes, Livia Aparecida Procopio

Avaliação da biocompatibilidade e atividade antimicrobiana in vitro da matriz de Hidrogel associada ao extrato glicólico do Punica granatum L. (romã) / Livia Aparecida Procopio Gomes. - São José dos Campos : [s.n.], 2017.

43 f. : il.

Dissertação (Mestrado em Biopatologia Bucal) - Pós-graduação em Biopatologia Bucal - Universidade Estadual Paulista (Unesp), Instituto de Ciência e Tecnologia, São José dos Campos, 2017.

Orientadora: Samira Esteves Afonso Camargo.

1. Hidrogel. 2. Matriz. 3. Punica granatum L. 4. Citotoxicidade. 5. Genotoxicidade. I. Camargo, Samira Esteves Afonso, orient. II. Universidade Estadual Paulista (Unesp), Instituto de Ciência e Tecnologia, São José dos Campos. III. Universidade Estadual Paulista 'Júlio de Mesquita Filho' - Unesp. IV. Universidade Estadual Paulista (Unesp). V. Título.

BANCA EXAMINADORA

Prof^a Adj. Luciane Dias de Oliveira

Universidade Estadual Paulista (Unesp)

Instituto de Ciências e Tecnologia

Campus de São José dos Campos

Prof^a Dr^a Luana Marotta Reis de Vasconcelos

Universidade Estadual Paulista (Unesp)

Instituto de Ciências e Tecnologia

Campus de São José dos Campos

Prof. Dr. Jonatas Rafael de Oliveira

Universidade Estadual Paulista (Unesp)

Instituto de Ciências e Tecnologia

Campus de São José dos Campos

São José dos Campos, 05 de dezembro de 2017.

DEDICATÓRIA

Aos meus pais, Rosângela e Sebastião (in memoriam), que em nenhum momento mediram esforços para realização dos meus sonhos, que me guiaram pelos caminhos corretos, me ensinaram a fazer as melhores escolhas, me mostraram que a honestidade e o respeito são essenciais à vida, e que devemos sempre lutar pelo que queremos. A eles devo a pessoa que me tornei, sou extremamente feliz e tenho muito orgulho por chamá-los de pai e mãe.

Aos meus irmãos Luciana, Júnior e Patrícia, pelo carinho, pela ajuda, pela compreensão e por estarem sempre do meu lado me dando força e apoio em todos os momentos, obrigada pelo amor e amizade.

Ao meu marido Fabrício, pelo companheirismo, carinho, compreensão e por estar sempre ao meu lado me dando apoio e incentivo para me tornar uma pessoa melhor a cada dia. Sou muito feliz ao seu lado.

A minha filhinha Isis, o melhor presente que Deus poderia me dar!

AGRADECIMENTOS

Á Deus, meu refúgio e força, onde sempre encontrei respostas para os meus problemas.

Á minha orientadora, Profa. Samira Esteves Afonso Camargo, pelo carinho, atenção, paciência e disposição sem medida para ajudar, pelas valiosas sugestões para a elaboração e enriquecimento desse trabalho.

A todos os professores do programa de pós-graduação em Biopatologia Bucal, pela colaboração e conhecimentos transmitidos, em especial a professora Luciane pelo apoio e por toda ajuda para que eu conseguísse concluir o mestrado. Por estarem sempre dispostos a atender, ensinar e ajudar os alunos sempre com muita dedicação, paciência e amizade.

Aos colegas do Programa de Pós-Graduação, pelos bons momentos, conversas e aprendizados.

Enfim a todos que direta ou indiretamente fizeram parte dessa história. Meu carinho e muito obrigado!

*"De tudo ficam três coisas:
A certeza de que estamos sempre começando
A certeza de que é preciso continuar
E a certeza de que podemos ser interrompidos antes de
terminarmos.
Devemos fazer da interrupção um novo caminho,
Da queda uma dança
Do medo uma escada
Do sonho uma ponte
Da procura um encontro."*

(Fernando Sabino)

SUMÁRIO

RESUMO	7
ABSTRACT	8
1 INTRODUÇÃO	10
2 PROPOSIÇÃO	15
3 MATERIAL E MÉTODOS.....	16
3.1 Confeccões dos grupos experimentais	16
3.2 Preparo e plaqueamento do <i>HydroMatrix Peptide Cell Culture Matriz</i>..	16
3.3 Avaliação da Atividade Antimicrobiana.....	17
3.3.1 Determinação da CIM e CBM do extrato de romã.....	18
3.3.2 Avaliação da atividade antimicrobiana em biofilme de <i>E. faecalis</i>.....	20
3.4 Análises de Biocompatibilidade	21
3.4.1 Cultura celular de macrófagos (RAW 264.7)	22
3.4.2 Citotoxicidade - Ensaio de MTT	23
3.4.3 Genotoxicidade - Ensaio de Micronúcleo.....	25
4 RESULTADOS	26
4.1 CIM e CBM do extrato de romã.....	26
4.2 Atividade antimicrobiana em biofilme de <i>E. faecalis</i>	28
4.3 Ensaio de Citotoxicidade	29
4.4 Ensaio de Genotoxicidade.....	31
5 DISCUSSÃO	32
6 CONCLUSÃO	39
REFERÊNCIAS	40

Gomes LAP. Avaliação da biocompatibilidade e atividade antimicrobiana *in vitro* da matriz de Hidrogel associada ao extrato glicólico do *Punica granatum* L. (romã) [dissertação]. São José dos Campos (SP): Universidade Estadual Paulista (Unesp), Instituto de Ciência e Tecnologia; 2017.

RESUMO

A matriz de hidrogel é um biomaterial de nanofibra peptídica tridimensional que induz o crescimento, migração e proliferação celular, assim favorecendo a regeneração tecidual. O objetivo deste trabalho foi avaliar a biocompatibilidade e a atividade antimicrobiana da matriz de hidrogel associado ao extrato romã e ao antimicrobiano ciprofloxacino. Para isso, foram realizadas análises microbiológicas sobre *Enterococcus faecalis* (ATCC 4083) em cultura planctônica, por meio d ensaio de microdiluição em caldo e em biofilme pelo teste de MTT. Para os ensaios da biocompatibilidade, foi utilizada cultura de macrófagos (RAW 264.7). A citotoxicidade foi avaliada pelo ensaio de MTT e a genotoxicidade foi realizado pelo teste de micronúcleo. A análise estatística foi realizada pelos testes ANOVA e Tukey, adotando o nível de significância 5%. Os resultados demonstraram que a matriz de hidrogel associado ao extrato de romã não apresentou atividade antimicrobiana para a cultura planctônica como para o biofilme de *E. faecalis*. Porém, não foi citotóxico e genotóxico para RAW 264.7. Por outro lado, o antimicrobiano ciprofloxacino apresentou atividade antimicrobiana sobre *E. faecalis*, além de ter apresentado efeitos citotóxico e genotóxico para os macrófagos. Com isso, foi possível concluir que o extrato de romã associado ou não a matriz de hidrogel apresenta ausência de citotóxico, genotóxico e efeito antimicrobiano.

Palavras-chave: Hidrogel. Matriz. Células. *Punica granatum*. *Enterococcus faecalis*. Citotoxicidade. Genotoxicidade.

Gomes LAP. *Evaluation of biocompatibility and antimicrobial action in vitro of a hydrogel scaffolds Hydromatrix associated to glycolic extract of Punica granatum (pomegranate) [dissertation]. São José dos Campos (SP): São Paulo State University (Unesp), Institute of Science and Technology; 2017.*

ABSTRACT

*The hydrogel matrix is a three-dimensional peptide nanofiber biomaterial that induces cell growth, migration and proliferation, thus favoring tissue regeneration. The objective of this work was to evaluate the biocompatibility and antimicrobial activity of the hydrogel matrix associated with the pomegranate extract and the antimicrobial ciprofloxacin. For this, microbiological analyzes on *Enterococcus faecalis* (ATCC 4083) were carried out in planktonic culture, by means of the microdilution test in broth and in biofilm by the MTT test. For the biocompatibility assays, macrophage culture (RAW 264.7) was used. Cytotoxicity was assessed by the MTT assay and genotoxicity was performed by the micronucleus test. Statistical analysis was performed by the ANOVA and Tukey tests, adopting the significance level 5%. The results showed that the hydrogel matrix associated with the pomegranate extract did not show antimicrobial activity for the planktonic culture as for the *E. faecalis* biofilm. However, it was not cytotoxic and genotoxic for RAW 264.7. On the other hand, the antimicrobial ciprofloxacin showed antimicrobial activity on *E. faecalis*, besides having cytotoxic and genotoxic effects for the macrophages. With this, it was possible to conclude that the pomegranate extract associated or not with the hydrogel matrix shows absence of cytotoxic, genotoxic and antimicrobial effect.*

Keywords: Hydrogel. Scaffold. Cells. Punica granatum. Enterococcus faecalis. Cytotoxicity. Genotoxicity.

1 INTRODUÇÃO

A engenharia de tecidos emergiu recentemente como uma estratégia alternativa para reparo e regeneração de defeitos ósseos. Nesta estratégia, um andaime ou matriz biodegradável é frequentemente utilizado juntamente com células osteogênicas e / ou fatores indutores de osso. Uma matriz para regeneração óssea deve satisfazer requisitos básicos, tais como biocompatibilidade, estrutura de poros interligada para crescimento de tecido, e degradação controlada com produtos de degradação fisiologicamente compatíveis. Para satisfazer essas necessidades, vários polímeros biodegradáveis naturais vem sendo estudados e desenvolvidos (Igwe, Mikael, Nukavarapu, 2014).

Estudos recentes tem se esforçado para desenvolver biomateriais com capacidade de interagir com o ambiente biológico, para melhorar a resposta biológica e a interação do tecido/superfície, bem como pelo desenvolvimento de materiais bio-absorvíveis que sofram uma degradação progressiva, enquanto regeneram e tratam os tecidos. Os polímeros biodegradáveis de natureza sintética como poliglicólido (PGA), poliácido (PLA), polidioxanona (PDS), poli (3-caprolactona) (PCL), poli-hidroxi-butirato (PHB), poliortoéster, quitosano, poli (2-hidroxietil-metacrilato) (PHEMA), ácido hialurônico e outros hidrogéis foram estudados e usados extensivamente em muitas aplicações na engenharia tecidual, tais como substituição óssea, reparação de fraturas ósseas, cartilagens, meniscos e disco intervertebral. Em particular, os polímeros sintéticos biodegradáveis estão sendo bastante estudados uma vez que permitem um melhor controle das suas propriedades físico-químicas e também têm sido utilizados com sucesso em aplicações clínicas (Fukushima, 2012).

Na engenharia tecidual, as células e os fatores de crescimento são combinados com um suporte (ou matriz) biodegradável poroso para reparar e regenerar o tecido. Este suporte atua como uma matriz temporária enquanto as células segregam a matriz extracelular que é necessária para a regeneração do tecido. Os suportes podem ser utilizados para induzir a formação do tecido desejado após o crescimento de células a partir de áreas circundantes e como transportadores para células autógenas semeadas que são cultivadas em biorreatores e subsequentemente reimplantadas para o hospedeiro como um material que promove o funcionamento das células (Hayashi et al., 2016).

HydroMatrixTM é uma matriz de nanofibra peptídica tridimensional que promove o crescimento e migração celular. O HydroMatrix utiliza peptídeos específicos que formam uma matriz de hidrogel peptídica a partir de fluídos precursores em materiais altamente reticulados em resposta a aumentos da temperatura ou força iônica. A transformação rápida desta solução em gel de peptídeo gera uma matriz de nanofibras peptídicas para cultura de células na engenharia de tecidos (Technical Bulletin, Sigma Aldrich).

Na Odontologia, novos produtos são lançados constantemente no mercado. Tais produtos são utilizados em íntimo contato com tecidos biológicos como polpa, dentina, tecido periodontal e osso alveolar. Dessa forma, os biomateriais devem ser utilizados com cautela e sua indicação nas diversas situações clínicas deve ser sempre bem avaliada, levando em consideração critérios clínicos e éticos quanto aos riscos e benefícios do tratamento. Para isso, existe a necessidade de o cirurgião-dentista conhecer as características e propriedades dos biomateriais.

A alta prevalência de *Enterococcus faecalis* em periodontites apicais secundárias vem sendo amplamente relatado (Stuart et al., 2006; Chávez de Paz et al., 2010). O *E. faecalis* é uma bactéria gram-positiva, anaeróbia facultativa, não esporulada e altamente resistente à ação de antimicrobianos. Isso pode ser

atribuído à sua habilidade de resistir por longos períodos sem nutrientes, sobreviver em mono espécies e invadir túbulos dentinários (Cheng et al., 2012). Esta bactéria tem capacidade de formar biofilme, que fica aderido em superfícies como a dentina. Além disso, produzem polissacarídeos extracelulares que agem como adesivo natural que imobiliza células, e que o torna altamente resistente, em função da variação fenotípica e genotípica proporcionada pelo biofilme (Garcez et al., 2006; Bergmans et al., 2008; George; Kishen, 2008; Chaves de Paz, 2010; Souza et al., 2010).

O uso de plantas medicinais no tratamento de doenças vem aumentando, sendo que no Brasil, tanto nos grandes centros comerciais quanto no interior, o comércio e a utilização de plantas medicinais são atividades muito difundidas, às quais são atribuídas diversas causas, sejam de ordem médica, social, cultural, econômica ou filosófica (Peron et al., 2008). Segundo Veiga Jr. et al. (2005), a Organização Mundial de Saúde (OMS) define planta medicinal como sendo qualquer vegetal que possui substâncias que podem ser utilizadas com fins terapêuticos ou que sejam utilizadas na produção de fármacos semi-sintéticos.

Os fitoterápicos são medicamentos produzidos a partir de plantas medicinais, sendo utilizados com finalidade no tratamento de doenças. Entretanto, pesquisas com plantas medicinais devem ser realizadas, com o propósito da verificação de sua efetividade, bem como ausência de toxicidade (ANVISA, 2004).

Uma planta medicinal bastante estudada é a *Punica granatum* L. (romã), classificada como um arbusto originário do Irã, atualmente é cultivado pelo Mediterrâneo, China, Índia, África do Sul e América (Abdollahzadeh et al., 2011; Glazer et al., 2012; Janani, Estherlydia, 2013; Dastjerdi et al., 2014; Betanzos-Cabrera et al., 2015; Shaygannia et al., 2016), pertence a família Punicaceae e é composta por flores, cascas, frutos, raízes e sementes (Dastjerdi et al., 2014). O arbusto apresenta de 1,5 a 5 m de altura com ramos espinhosos

(Shaygannia et al., 2015). As folhas são brilhantes e possuem cerca de 7,6 cm de comprimento (Qnais et al., 2007; Janani, Estherlydia, 2013) e as flores podem ser vermelhas, laranjas ou rosas (Zarfeshany, 2014). A fruta madura possui de 5 a 20 cm de diâmetro, uma casca vermelho escuro, o formato de uma granada e o peso varia de menos de 200 g a mais de 800 g (Janani, Estherlydia, 2013; Shaygannia et al., 2016). A fruta contém muitas sementes que armazenam pequenas quantidades de suco vermelho e são separadas por uma região branca conhecida por pericarpo membranoso (Janani, Estherlydia, 2013).

P. granatum L. tem um amplo espectro de ação devido a seus fitoconstituintes tais como taninos, polifenóis, alcalóides, flavonóides, antocianinas, ácido ascórbico, ácidos graxos e ácido ursólico. O óleo da semente contém estrogênios que podem atuar no câncer de pele e pulmão, as frutas e brotos podem ser usados no tratamento de disenteria, parasitas intestinais e em casos de diarreia. Já o suco e as sementes podem ser utilizados no tratamento de hemorróidas e sangramentos de nariz e gengiva, bem como tônico para garganta (Shaygannia et al., 2016). Apresenta ainda propriedades anti-aterogênicas, anti-hipertensivas podendo ser utilizado na prevenção e tratamento de diversos tipos de câncer, doenças cardiovasculares, osteoartrite e artrite reumatóide, atua na cicatrização de feridas e no sistema reprodutor (Zarfeshany, 2014), além de ter propriedades bactericida, antifúngica, antiviral, apresentar modulação imune, antioxidante, antiinflamatória, antiaterosclerótica, e combater infecções bacterianas inclusive com microrganismos multiresistentes (Abdollahzadeh et al., 2011; Choi et al., 2011; Aníbal, 2012; Fawole, 2012; Bakkiyaraj et al., 2013; de Oliveira et al., 2013; Qabaha, 2013; Dastjerdi et al., 2014; Zarfeshany 2014; Betanzos-Cabrera et al., 2015; Shaygannia et al. 2016).

Diante do exposto, o desenvolvimento e a investigação de novos materiais, associando propriedades de plantas medicinais, como a *P. granatum*, com biomateriais pode originar novos produtos com propriedades físicas,

químicas e biológicas adequadas para aplicações em engenharia tecidual sendo uma alternativa aos tratamentos convencionais. Assim, este estudo *in vitro* avaliou a matriz de hidrogel associada ao extrato romã verificando sua ação sobre a proliferação celular e sua atividade antimicrobiana, objetivando sua utilização na Odontologia.

2 PROPOSIÇÃO

O objetivo do presente estudo foi avaliar *in vitro* a biocompatibilidade, proliferação celular e atividade antimicrobiana da associação da matriz de hidrogel com diferentes concentrações do extrato de romã.

Os objetivos específicos foram:

- a) Determinar a Concentração Inibitória Mínima (CIM) e a Concentração Bactericida Mínima (CBM) para a cepa de *Enterococcus faecalis* (ATCC 4083) na forma planctônica;
- b) Avaliar a ação antimicrobiana do biomaterial sobre cultura planctônica e biofilme de *Enterococcus faecalis* (ATCC 4083);
- c) Analisar sua citotoxicidade através do teste de MTT em macrófagos (RAW 264.7);
- d) Avaliar sua genotoxicidade pelo teste de micronúcleo em macrófagos (RAW 264.7);

6 CONCLUSÃO

Conclui-se que nas condições deste estudo, a associação da matriz hidrogel ao extrato de romã foi biocompatível para macrófagos, uma vez que não apresentou citotoxicidade e genotoxicidade. No entanto, esta associação não apresentou atividade antimicrobiana para *E. faecalis*.

REFERÊNCIAS*

Abdollahzadeh S, Mashouf R, Mortazavi H, Moghaddam M, Roozbahani N, Vahedi M. Antibacterial and antifungal activities of *Punica granatum* peel extracts against oral pathogens. J Dent (Tehran). 2011;8(1):1-6.

Akiyama N, Fukuda TY, Takahashi H, Koji T. In situ tissue engineering with synthetic self-assembling peptide nanofiber scaffolds, PuraMatrix, for mucosal regeneration in the rat middle-ear. Int J Nanomed. 2013;8:2629-40.

Anibal PC, Peixoto IT, Foglio MA, Hofling JF. Antifungal activity of the ethanolic extracts of *Punica granatum* L. and evaluation of the morphological and structural modifications of its compounds upon the cells of *Candida* spp. Braz J Microbiol. 2013;44(3):839-48.

Bakkiyaraj D, Nandhini JR, Malathy B, Pandian SK. The anti-biofilm potential of pomegranate (*Punica granatum* L.) extract against human bacterial and fungal pathogens. Biofouling. 2013;29(8):929-37.

Bergmans L, Moisiadis P, Huybrechts B, Van Meerbeek B, Quirynen M, Lambrechts P. Effect of photo-activated disinfection on endodontic pathogens ex vivo. Int Endod J. 2008;41(3):227-39.

Betanzos-Cabrera G, Montes-Rubio PY, Fabela-Illescas HE, Belefant-Miller H, Cancino-Diaz JC. Antibacterial activity of fresh pomegranate juice against clinical strains of *Staphylococcus epidermidis*. Food Nutr Res. 2015;59:27620.

Bhattacharya M, Malinen MM, Lauren P, Lou YH, Kuisma SW, Kanninen L, Lille , Corlu A, Guillouzo CG, Ikkala O, Laukkanen A, Urtti A, Yliperttula M. Nanofibrillar cellulose hydrogel promotes three-dimensional liver cell culture. J Control Release. 2012;164(3):291-8.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), Resolução RDC n.48 - Registro de Medicamentos Fitoterápicos. 16 de março de 2004.

Chávez de Paz LE, Bergenholtz G, Svensäter G. The effects of antimicrobials on endodontic biofilm bacteria. J Endod. 2010;36(1):70-7.

* Baseado em: International Committee of Medical Journal Editors Uniform Requirements for Manuscripts Submitted to Biomedical journals: Sample References [Internet]. Bethesda: US NLM; c2003 [atualizado 04 nov 2015; acesso em 25 jun 2016]. U.S. National Library of Medicine; [about 6 p.]. Disponível em: http://www.nlm.nih.gov/bsd/uniform_requirements.html

Cheng X, Guan S, Lu H, Zhao C, Chen X, Li N, Bai Q, Tian Y, Yu Q. Evaluation of the bactericidal effect of Nd:YAG, Er:YAG, Er,Cr:YSGG laser radiation, and antimicrobial photodynamic therapy (aPDT) in experimentally infected root canals. *Lasers Surg Med.* 2012;44(10):824-31.

Choi JG, Kang OH, Lee YS, Chae HS, Oh YC, Brice OO, et al. In Vitro and In Vivo Antibacterial Activity of *Punica granatum* Peel Ethanol Extract against *Salmonella*. *Evid Based Complement Alternat Med.* 2011;2011:690518.

Dastjerdi EV, Abdolazimi Z, Ghazanfarian M, Amdjadi P, Kamalinejad M, Mahboubi A. Effect of *Punica granatum* L. Flower water extract on five common oral bacteria and bacterial biofilm formation on orthodontic wire. *Iran J Public Health.* 2014;43(12):1688-94.

de Oliveira JR, de Castro VC, das Gracias 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.

de Oliveira JR, de Castro VC, das Gracias Figueiredo Vilela P, Camargo SE, Carvalho CA, Jorge AO, et al. Atividade antimicrobiana do extrato glicólico de *Punica granatum* L. (romã) sobre *Staphylococcus* spp., *Streptococcus mutans* e *Candida* spp. XV Encontro Latino Americano de Iniciação Científica e XI Encontro Latino Americano de Pós-Graduação. Universidade do Vale do Paraíba, 2011.

Fawole OA, Makunga NP, Opara UL. Antibacterial, antioxidant and tyrosinase-inhibition activities of pomegranate fruit peel methanolic extract. *BMC Complement Altern Med.* 2012;12:200.

Fukushima K, Wu Meng-Hsiu, Bocchini S, Rasyda A, Yang MC. PBAT based nanocomposites for medical and industrial applications. *Materials Science and Engineering.* 2012;136(6):1331-51.

Garcez AS, Núñez SC, Lage-Marques JL, Jorge AO, Ribeiro MS. Efficiency of NaOCl and laser-assisted photosensitization on the reduction of *Enterococcus faecalis* in vitro. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 2006;102(4):93-8.

George S, Kishen A. Augmenting the antibiofilm efficacy of advanced noninvasive light activated disinfection with emulsified oxidizer and oxygen carrier. *J Endod.* 2008;34(9):1119-23.

Glazer I, Masaphy S, Marciano P, Bar-Ilan I, Holland D, Kerem Z, et al. Partial identification of antifungal compounds from *Punica granatum* peel extracts. J Agric Food Chem. 2012;60(19):4841-8.

Hayashi K, Shino HO, Shiga T, Onodera S, Saito A, Shibahara T, Azuma T. Transplantation of human-induced pluripotent stem cells carried by self-assembling peptide nanofiber hydrogel improves bone regeneration in rat calvarial bone defects. BDJOpen [Internet] 2016.[acesso em 2016 Dez 02]; Disponível em: www.nature.com/articles/bdjopen20157.pdf

Igwe JC, Mikael PE, Nukavarapu SP. Design, fabrication and in vitro evaluation of a novel polymer-hydrogel hybrid scaffold for bone tissue engineering. J Tissue Eng Regen Med. 2014;8(2):131-42.

Janani J, Estherlydia D. Antimicrobial activities of *Punica granatum* extracts against oral microorganisms. International Journal of PharmTech Research. 2013;5(3):973-977.

Peron AP, Marcos MC, Cardoso SC, Vicentini VEP. Avaliação do potencial citotóxico dos chás de *Caellia sinensis* L. e *Cassia angustifolia* Vahl em sistema teste vegetal. Arq Ciênc Saúde Unipar, Umuarama. 2008;12(1):51-4.

Qabaha KI. Antimicrobial and free radical scavenging activities of five Palestinian medicinal plants. Afr J Tradit Complement Altern Med. 2013;10(4):101-8.

Shaygannia E, Bahmani M, Zamanzad B, Rafieian-Kopaei M, A review study on *Punica granatum* L. J Evid-Based Complementary Altern Med. 2016; 21(3):221-7.

Souza LC, Brito PR, de Oliveira JC, Alves FR, Moreira EJ, Sampaio-Filho HR, Rôças IN, Siqueira JF Jr. Photodynamic therapy with two different photosensitizers as a supplement to instrumentation/irrigation procedures in promoting intracanal reduction of *Enterococcus faecalis*. J Endod 2010; 36(2):292-6.

Stuart CH, Schwartz SA, Beeson TJ, Owatz CB. *Enterococcus faecalis*: its role in root canal treatment failure and current concepts in retreatment. J Endod 2006; 32(2):93-8.

Veiga Jr VF, Pinto AC, Maciel MAM. Medicinal plants; safe cure? Quím Nov.

2005;28(3):519-28.

Zarfeshany A, Asgary S, Javanmard SH. Potent health effects of pomegranate. *Advanced biomedical research*. 2014; 25(3):100.

