



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

LÍGIA NISHIAMA THEODORO

**ANÁLISE DA BIOCOMPATIBILIDADE E AÇÃO ANTIMICROBIANA
DA MATRIZ DE HIDROGEL ASSOCIADA AO EXTRATO DE
*Stryphnodendron barbatiman***

2017

**ANÁLISE DA BIOCOMPATIBILIDADE E AÇÃO ANTIMICROBIANA
DA MATRIZ DE HIDROGEL ASSOCIADA AO EXTRATO DE
*Stryphnodendron barbatiman***



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/Imunologia.

Orientadora: Profa. Adj. Samira Esteves Afonso Camargo

São José dos Campos

2017



02
+ 343
+ 220

Instituto de Ciência e Tecnologia [internet] Normalização de tese e dissertação
[acesso em 2016]. 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).

Theodoro, Lígia Nishiana

Análise da biocompatibilidade e ação antimicrobiana da matriz de hidrogel associada ao extrato de *Stryphnodendron barbatiman* / Lígia Nishiana Theodoro.
- São José dos Campos : [s.n.], 2017.
44 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. Biomateriais. 2. Biocompatibilidade. 3. Antimicrobiana. 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

Profa. Adj. Samira Esteves Afonso Camargo (Orientadora)

Universidade Estadual Paulista (Unesp)

Instituto de Ciência e Tecnologia

Campus de São José dos Campos

Profa. Dra. Kátia de Araújo Prado Ferreira Leite

Universidade Paulista (UNIP)

Campus de São José dos Campos

Profa. Dra. Mirian Marcolan de Mello

Universidade Paulista (UNIP)

Campus de São José dos Campos

São José dos Campos, 09 de janeiro de 2017.

DEDICATÓRIA

Ao meu Senhor e meu Deus, toda honra e toda glória para Ti.

Aos meus amados pais, por toda cumplicidade e dedicação.

À minha irmã gêmea, pela união e companheirismo.

Ao meu esposo, grande amor da minha vida.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus por me presentear com inúmeras graças em minha vida, inclusive esta linda oportunidade aprendizado. Que a sabedoria divina me ilumine e me capacite para honrar e retribuir todas bênçãos em minha vida.

Aos que são a razão do meu viver, agradeço profundamente minha família pelo amor que é fonte de motivação para alcançar meus objetivos. Em especial, meu esposo Bruno Vilela de Souza, muito obrigada pelo seu apoio, amor e carinho, que nossa sinergia continue sendo fonte de alegria, amor, força, determinação e perseverança. Aos meus pais, Vicente de Paulo Theodoro e Kayomi Nishiana Theodoro, que são meus melhores exemplos, agradeço imensamente pela dedicação na realização dos meus sonhos e a minha querida irmã Livia Nishiana Theodoro agradeço pela nossa amizade, cumplicidade, apoio e carinho.

Ao curso de Biopatologia Bucal, muito obrigada por esta oportunidade que proporcionou esta experiência incrível.

Aos colegas e os funcionários que convivi ao longo dessa jornada, agradeço pela companhia e contribuição.

Agradeço imensamente a professora Samira pela orientação, paciência e compreensão que contribuíram grandemente para minha formação acadêmica e para a conclusão deste trabalho.

A todos professores que foram essenciais na minha formação acadêmica.

Muito obrigada!

“O Altíssimo deu-lhes a ciência da medicina para ser honrado em suas maravilhas e dela se serve para acalmar as dores e curá-las, o farmacêutico faz misturas agradáveis e seu trabalho não terminará, até que a paz divina se estenda sobre a face da terra.” Eclesiástico, 38:6-8

SUMÁRIO

RESUMO	07
ABSTRACT	08
1 INTRODUÇÃO	09
2 PROPOSIÇÃO	17
3 MATERIAL E MÉTODOS	18
3.1 Grupos experimentais	18
3.2 Plaqueamento <i>HydroMatrix Peptide Cell Culture Scaffold</i> ...	18
3.3 Análises de Ação Antimicrobiana	20
3.3.1 Determinação da CIM e CMM do extrato <i>S. barbatiman</i> ..	21
3.3.2 Atividade antimicrobiana em biofilme de <i>E. faecalis</i>	22
3.4 Análises de Biocompatibilidade	24
3.4.1 Cultura celular de macrófagos (RAW 264.7)	24
3.4.2 Citotoxicidade – Ensaio de MTT	27
3.4.3 Genotoxicidade – Ensaio de Micronúcleo.....	28
4 RESULTADOS	29
4.1 CIM e CMM do extrato do <i>S. barbatiman</i>	29
4.2 Ação antimicrobiana em biofilme <i>E. faecalis</i>	32
4.3 Citotoxicidade – Ensaio de MTT	33
4.4 Ensaio de genotoxicidade.....	35
5 DISCUSSÃO.....	36
6 CONCLUSÃO.....	40
REFERÊNCIAS.....	41

Theodoro LN. Análise da biocompatibilidade e ação antimicrobiana da matriz de hidrogel associado ao extrato de *Stryphnodendron barbatiman* [dissertação]. São José dos Campos (SP): Universidade Estadual Paulista (Unesp), Instituto de Ciência e Tecnologia; 2017.

RESUMO

A matriz hidrogel é um biomaterial que mimetiza a matriz extracelular natural auxiliando na proliferação celular para a regeneração tecidual. A proposta deste estudo foi avaliar a biocompatibilidade e atividade antimicrobiana da matriz hidrogel associado ao extrato de *Stryphnodendron barbatiman* comparado ao antibiótico ciprofloxacino. Para as análises microbiológicas, foram realizados os testes sobre a cepa *Enterococcus faecalis* (ATCC 4083) em suspensão planctônica, por meio do ensaio de microdiluição e em biofilme pelo teste de MTT. Para os ensaios de biocompatibilidade foram utilizados macrófagos RAW 264.7 para verificar a citotoxicidade pelo ensaio de viabilidade celular MTT e a genotoxicidade pelo teste de micronúcleos. A análise estatística foi realizada pelo teste ANOVA e *Tukey*, adotando o nível de significância 5%. Os resultados demonstraram que a matriz de hidrogel associado ao barbatimão apresentou atividade antimicrobiana em planctônico somente na concentração 12,5 mg/mL. No entanto, não apresentou ação antimicrobiana em biofilme monotípico de *E. faecalis*. A matriz de hidrogel associado ao barbatimão não foi citotóxico, promovendo alta proliferação celular e não apresentou genotoxicidade para macrófagos. O antibiótico ciprofloxacino apresentou efetiva atividade antimicrobiana sobre *E. faecalis*, mas por outro lado foi citotóxico e genotóxico para macrófagos. Conclui-se que o extrato de *Stryphnodendron barbatiman* associado ou não a matriz de hidrogel apresentou pequena atividade antimicrobiana sobre *E. faecalis*, mas não foi citotóxico nem genotóxico para macrófagos.

Palavras-chave: Biocompatibilidade. Antimicrobiano. *Enterococcus faecalis*. Matriz hidrogel. *Stryphnodendron barbatiman*.

Theodoro LN. Analysis of the biocompatibility and antimicrobial action of the hydrogel matrix associated with Stryphnodendron barbatiman extract [dissertation]. São José dos Campos (SP): São Paulo State University, Institute of Science and Technology; 2017.

ABSTRACT

The hydrogel matrix can be useful for many applications in medical devices, this promissor biomaterial mimics the natural extracellular matrix and is able to enhance cell proliferation and tissue regeneration, also can control release of drugs. The purpose of this study was to evaluate the biocompatibility and antimicrobial activity of the hydrogel matrix associated with a natural extract from Brazil Stryphnodendron barbatiman compared to the ciprofloxacin. For the analysis of antimicrobial activity, the tests were performed on Enterococcus faecalis (ATCC 4083) in the planktonic suspension by the microdilution assay and biofilm by MTT assay. For biocompatibility assays macrophages RAW 264.7 were used to evaluate the cytotoxicity by cell viability assay (MTT) and genotoxicity by micronucleus test. Statistical analysis was performed by ANOVA and Tukey test, adopting a significance level of 5%. The results showed that the hydrogel matrix associated with S. barbatiman showed antimicrobial activity on planktonic only the concentration 12.5 mg/mL. However, showed no antimicrobial action in monotypic biofilms of E. faecalis. The hydrogel matrix associated with S. barbatiman was not cytotoxic, promoting high proliferation cell and was not genotoxic for macrophages. The antibiotic ciprofloxacin showed effective antimicrobial activity against E. faecalis, but was cytotoxic and genotoxic to macrophages. We conclude that the S. barbatiman extract with or without the hydrogel matrix showed little antimicrobial activity against E. faecalis, but it was not cytotoxic or genotoxic to macrophages.

Keywords: Biocompatibility. Antimicrobial. Enterococcus faecalis. Hydrogel matrix. Stryphnodendron barbatiman.

1 INTRODUÇÃO

A busca de novos e mais eficientes biomateriais para transposição clínica é um grande desafio para comunidade científica e imprescindível na área médica e odontológica visto que os avanços contínuos impactam na melhoria da qualidade de vida de muitos pacientes.

A Engenharia tecidual é uma ciência multidisciplinar que desenvolve maneiras de restaurar, manter ou aumentar as funções biológicas de diversos tecidos. Dentro disso, o desenvolvimento de nanofibras está sendo realizado para a regeneração de tecidos moles, ossos e cartilagem, hemostasia, sistema de liberação controlada de drogas, entre outras. Estes biomateriais denominados *scaffolds* ou matrizes possuem estrutura física tridimensional que mimetizam a matriz extracelular natural, exercendo função de suporte físico para as células, acelerando a proliferação celular e a regeneração tecidual, colaborando para reconstituição de diversos tecidos (Barbanti et al., 2005; Popat, 2011; Costa RG et al., 2012).

Na odontologia, muitos dos procedimentos realizados visam a substituição de tecidos ou elementos dentários perdidos, recorrendo à utilização de biomateriais sintéticos na tentativa da substituição destes tecidos danificados porém esses materiais podem apresentar algumas características negativas e em conjunto com o ambiente hostil da cavidade oral, podem ter sua vida relativamente curta e frequente necessidade de retratamento. Desta maneira, a área de engenharia tecidual representa para a odontologia contemporânea perspectivas para o desenvolvimento de novas estratégias e de metodologias mais eficientes para os pacientes da clínica, pois visam a regeneração do tecido ao invés da sua substituição (Rosa et al., 2012).

Na endodontia regenerativa grandes desafios são encontrados com relação às infecções endodônticas secundárias. A infecção da polpa dentária ocorre pelo ingresso de micro-organismos presentes na cavidade bucal, por meio do comprometimento da integridade dental devido a fraturas, acidentes no preparo cavitário, cáries profundas, entre outros. A invasão, instalação e multiplicação microbiológica no tecido pulpar leva a infecção, acarretando danos neste tecido que podem levar a necrose pulpar em casos avançados. Há uma grande variedade de micro-organismos da cavidade bucal capaz de colonizar o tecido pulpar, porém o perfil microbiológico nas infecções primárias ou não tratadas, demonstram que este tecido é um local favorável ao desenvolvimento de infecção polimicrobiana, diferentemente do que ocorre nas infecções secundárias, que persistem ao tratamento endodôntico e apresentam micro-organismos mais específicos. Dentre os micro-organismos existentes em infecções pulpares, *Enterococcus faecalis*, tem sido destacado principalmente pela sua alta prevalência, de até 90% dos casos, nas infecções pulpares secundárias, pois conseguem sobreviver e colonizar o canal radicular após o um procedimento mal sucedido (Dahlén et al., 2012; Endo et al., 2013; Jorge, 2012).

E. faecalis são cocos gram-positivos dispostos em pares ou cadeias, anaeróbios facultativos, catalase negativa, não formadores de esporos e seus principais fatores de virulência são a produção de ácido lipoteicóico, gelatinase, hialuronidase, citolisina, substâncias de agregação, feromonas e proteínas de choque térmico (Jorge, 2006). Outro fator muito importante sobre *E. faecalis* é sua resistência aos antibióticos, uma vez que podem produzir beta-lactamases e outros mecanismos de resistência contra a vancomicina e a cefalosporina, além de outras substâncias como hipoclorito de sódio e hidróxido de cálcio que são frequentemente utilizadas durante o tratamento endodôntico. Assim, as dificuldades em obter sucesso no tratamento das infecções pulpares secundárias resistentes, motivam o estudo de novas metodologias para estes casos (Ferrari,

Bombana, 2010).

A existência de células multipotentes altamente proliferativas presentes na polpa dentária, despertam novas possibilidades e expectativas promissoras na contemporânea engenharia tecidual endodôntica. Estudos demonstram que são necessários para dar início ao processo de diferenciação, as próprias células-tronco originadas da polpa dentária, uma matriz extracelular e fatores de crescimento. A associação das células-tronco da polpa com uma matriz estrutural promove o suporte físico que propicia a proliferação celular e a aplicação de substâncias sinalizadoras fornece o estímulo necessário para diferenciação celular. Este exposto abre um caminho com inúmeras possibilidades para diversos estudos, com o objetivo da regeneração do complexo dentino pulpar (Janjić et al., 2016; Cordeiro et al., 2008; Leal 2007; Soares AP et al., 2007).

Na literatura, o uso de *scaffolds* ou matrizes está em ascensão, uma vez que estes apresentam características capazes de promover a proliferação celular, além da possibilidade de controlar a liberação de substâncias antibióticas que possibilitam o controle de infecções. Há relatos bem-sucedidos de estudos *in vitro* que incorporaram substâncias antibióticas nestes *scaffolds*, demonstrando a ação de liberação controlada de antibióticos. Porém, ainda existe poucos estudos com relação aos mecanismos de eficácia e segurança desse tratamento (Drury, Mooney, 2003; Feng et al., 2010; Ruckh et al., 2012).

Feng et al. (2010) desenvolveram uma matriz de nanofibra composta pelo antibiótico doxíciclina e avaliaram o perfil de liberação deste antibiótico por meio da espectrofotometria e verificaram sua atividade antimicrobiana. A concentração do antibiótico apresentou duas fases, uma alta liberação inicial durante o primeiro dia, seguido por uma liberação lenta ao longo de 42 dias. A ação antimicrobiana foi testada no *Staphylococcus aureus* e na *Escherichia coli*, inibindo o crescimento desses micro-organismos. A longa duração da liberação

do antibiótico significa um importante progresso para o tratamento de infecções dentárias. Ruckh et al. (2012) desenvolveram um *scaffold* incorporado ao antibiótico rifamicina nas concentrações 10% e 20% de antibiótico. Os *scaffolds* foram colocados em contato com os micro-organismos *Pseudomonas aeruginosa* e *Staphylococcus epidermidis*. O *scaffold* liberou o antibiótico rifamicina em duas etapas, inicialmente é liberado uma dose em alta concentração num período curto de 1 a 2 horas, e posteriormente a liberação foi lenta e prolongada por 8 horas. Assim, com este mecanismo de liberação local da droga, obteve-se sucesso na eliminação dos micro-organismos, além da vantagem de se obter uma concentração alta inicial, evitando concentrações sistêmicas potencialmente tóxicas.

Especificamente na Endodontia, Bottino et al. (2013) avaliaram a atividade antimicrobiana sobre *Porphyromonas gingivalis* e *E. faecalis* de *scaffolds* de nanofibras associados a duas concentrações (5 e 25% em peso) de ciprofloxacina e metronidazol. Também a citotoxicidade destes *scaffolds* foi avaliado em células-tronco da polpa. Verificou-se por meio de cromatografia líquida de alta eficiência, que o período de liberação dos antibióticos foi de 48 horas. Os *scaffolds* contendo ciprofloxacina foram capazes de inibir o crescimento de *E. faecalis* em biofilme. A concentração de 25% em peso da ciprofloxacina foi tóxica para as células. Os autores sugerem que o *scaffold* de nanofibras contendo antibiótico pode ser um sistema seguro de liberação de drogas para a regeneração endodôntica.

O desenvolvimento de novos métodos de controle de infecções é uma preocupação extremamente importante, principalmente diante do aumento de cepas bacterianas resistentes aos antibióticos convencionais. Portanto, é pertinente pesquisas relacionadas aos fitoterápicos para desenvolvimento de novas alternativas no combate de micro-organismos. No Brasil, a rica biodiversidade oferece grande variedade botânica e o uso de plantas medicinais

viabiliza para ciência indícios favoráveis com pesquisas que envolvem fitoterápicos. Com o intuito de inovar, propõe-se neste trabalho a utilização do *Stryphnodendron barbatiman*, uma substância fitoterápica farmacologicamente ativa para associá-la ao *scaffold* ou matriz de hidrogel com o objetivo de potencializar seu efeito reparador.

O *Stryphnodendron barbatiman* origina-se de uma planta nativa do cerrado brasileiro, conhecida também como barbatimão, barba-de-timão ou casca-da-vidrigindade que é amplamente utilizado no Brasil pelo conhecimento empírico popular por apresentar propriedades medicinais benéficas relacionadas as ações cicatrizante, adstringente, antibiótica, antifúngica, anti-inflamatória, anti-oxidadante entre outras. A casca é a parte mais utilizada desta planta e sua composição química é a responsável pelas atividades biológicas desta planta que é composta principalmente por taninos condensados (protoantocianidinas) e outros constituintes químicos em menor quantidade (Ferreira et al., 2013; Monteiro et al., 2005; Nascimento et al., 2016; Passaretti et al., 2016; Chaves et al., 2016).

Com relação a atividade antimicrobiana do barbatimão é possível encontrar na literatura estudos bem-sucedidos da aplicação deste fitoterápico em diversos micro-organismos. No estudo de Oliveira et al. (2013) o *S. barbatimam* foi avaliado com relação a sua ação antimicrobiana em cepas clínicas e *American Type Culture Collection* (ATCC) de *Streptococcus mutans* e *Candida albicans* e a citotoxicidade e produção de citocinas em macrófagos. Verificou-se que o extrato de *S. barbatiman* apresentou uma ação antimicrobiana mais sensível ao *S. mutans* que para *C. albicans*, além de ter sido considerado não citotóxico. A suscetibilidade *in vitro* de micro-organismos patogênicos da cavidade oral (*S. mutans*, *S. aureus*, *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* e *C. albicans*) aos extratos aquosos e etanólicos do barbatimão foi avaliada por Santos et al. (2004), os resultados mostraram que os extratos etanólicos

apresentaram maior ação antimicrobiana em relação ao extrato aquoso, demonstrando que a solução extratora pode influenciar na extração qualitativa e quantitativa dos componentes do barbatimão com consequências na atividade biológica, neste trabalho os resultados mostraram que o barbatimão teve ação antimicrobiana em todos micro-organismos testados e concluíram que os extratos de barbatimão apresentam alta atividade antimicrobiana contra os micro-organismos patogênicos da cavidade oral.

Estudos *in vivo* foram realizados com o barbatimão com o intuito de avaliar a toxicidade via oral das concentrações de barbatimão 500, 1.000, 2.000, 3.000, 4.000, e 5.000 mg·kg⁻¹ em ratos *Swiss* e após 14 dias foram realizadas análises comportamentais e exames histológicos. Os resultados mostraram que as concentrações de barbatimão apresentaram baixa toxicidade o que pode-se sugerir que este possa ser administrado com grande nível de segurança (Costa MA et al., 2013). Ainda, Melo et al. (2007) avaliaram o efeito da diminuição de dor do barbatimão em modelos animais através de testes de contorção abdominal induzidos pelo ácido acético, injeção intraplantar de formalina e placa quente. O grupo tratado com o barbatimão demonstrou um efeito evidente na diminuição de dor quando comparado ao grupo controle.

Com relação as propriedades de regeneração celular, o barbatimão demonstrou em alguns estudos a capacidade de estimular o processo de cicatrização. Seus componentes proporcionam um efeito adstringente que são capazes de ligar às proteínas dos tecidos lesados, criando uma camada protetora que isola o local da ferida, reduzindo a permeabilidade e exsudação da ferida e promovendo a reparação dos tecidos, além de apresentarem propriedades antimicrobianas, vasoconstritoras e anti-inflamatórias que auxiliam na regeneração dos tecidos (Passaretti et al., 2016). Chaves et al. (2016), realizaram um estudo *in vivo*, utilizando como modelo experimental a membrana do ovo embrionado de galinha para avaliar a atividade angiogênica da solução aquosa

de barbatimão 30 mg/mL comparado ao conhecido indutor de angiogênese Regederm®. Os resultados demonstraram que a solução de barbatimão apresentou um percentual de vascularização de 50,4% e o controle indutor Regederm® de 52,9%, concluindo que a aplicação da solução aquosa de barbatimão pode ser benéfica em situações clínicas como na reparação e cicatrização de feridas que estão relacionadas aos estímulos angiogênicos. Ainda, Lima et al. (2016), avaliaram o creme de barbatimão 5% como adjuvante na reparação tecidual em lesões cutâneas de coelho. Foram induzidas quatro feridas cutâneas na região dorsal dos coelhos que foram submetidos ao tratamento com creme de barbatimão 5% e aos controles. As feridas foram analisadas por meio de exames clínicos diários durante 21 dias corridos e por análises histológicas. Os resultados demonstraram que o creme de barbatimão 5% auxiliou no processo de reparação da pele em coelhos quando comparado aos demais tratamentos, promovendo a proliferação de fibroblastos, o aumento da produção de colágeno, a reepitelização e a neovascularização. Concluindo que o creme de barbatimão 5% é eficiente e economicamente viável como adjuvante no processo de cicatrização de feridas cutâneas.

A associação do extrato de barbatimão a um biomaterial foi observado no estudo de Borges et al. (2015) em que avaliaram o comportamento de liberação do extrato hidroetanólico do barbatimão carregados por biomembranas de látex obtidos a partir de seringueira *Hevea* por espectroscopia de ultravioleta-visível. Os resultados demonstraram nas análises de espectroscopia de infravermelho em reflectância total atenuada que não houve interação química que pudessem alterar a estrutura molecular entre o carreador e o extrato de barbatimão e a partir da microscopia eletrônica de varredura foi possível observar o extrato na superfície da biomembrana de látex. O comportamento de liberação controlada ocorreu inicialmente com uma liberação rápida, seguida de uma liberação mais lenta do extrato de barbatimão com a liberação sustentada

por 7 dias, este estudo demonstra a possibilidade da associação de extratos fitoterápicos em biomateriais.

Diante do exposto, os grandes avanços da endodontia regenerativa indicam que benefícios terapêuticos estarão disponíveis em um futuro próximo. No desenvolvimento de novas tecnologias aplicadas a endodontia contemporânea é importante explorar alternativas para ampliar este campo em rápida ascensão na busca de melhores e mais eficazes associações entre as células, matriz extracelular e fatores de crescimento para o controle de infecção e regeneração da polpa dentária, afim de se estabelecer um protocolo seguro, eficaz e com ótimo custo-benefício. Desta forma, este estudo avaliou *in vitro* a matriz de hidrogel associado ao extrato *Stryphnodendron barbatiman* (barbatimão) comparando ao antibiótico ciprofloxacino, visando conhecer sua biocompatibilidade em células macrófagos e atividade antimicrobiana em cepas de *E. faecalis*.

2 PROPOSIÇÃO

O objetivo geral deste estudo foi avaliar *in vitro* a atividade antimicrobiana e a biocompatibilidade da matriz de hidrogel (*Hydromatrix* – *Sigma-Aldrich*) associado ao extrato do *Stryphnodendron barbatiman* (barbatimão) ou ao ciprofloxacino.

Os objetivos específicos foram:

- a) Determinar a Concentração Inibitória Mínima (CIM) e Concentração Microbicida Mínima (CMM) para a cepa *Enterococcus faecalis* (ATCC 4083) na forma planctônica, por meio do ensaio de microdiluição em caldo;
- b) Avaliar a ação antimicrobiana no biofilme de *Enterococcus faecalis* (ATCC 4083);
- c) Verificar a citotoxicidade através do teste de MTT em macrófagos (RAW 264.7);
- d) Avaliar a genotoxicidade pelo teste de micronúcleo em macrófagos (RAW 264.7).

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Grupos experimentais

Neste estudo foram considerados quatro grupos experimentais de estudo, sendo o grupo “A” o de maior interesse composto pela matriz de hidrogel associado ao extrato do *Stryphnodendron barbatiman* e pelos grupos controle:

- a) Grupo A: Matriz de hidrogel associado ao extrato do *Stryphnodendron barbatiman*;
- b) Grupo B: Matriz de hidrogel associado ao antibiótico ciprofloxacino;
- c) Grupo C: Matriz de hidrogel sem associação;
- d) Grupo D: extrato de *Stryphnodendron barbatiman* isolado.

Os grupos controles (B, C e D) são importantes dados comparativos para se obter a real dimensão da efetividade do grupo de interesse (Grupo A).

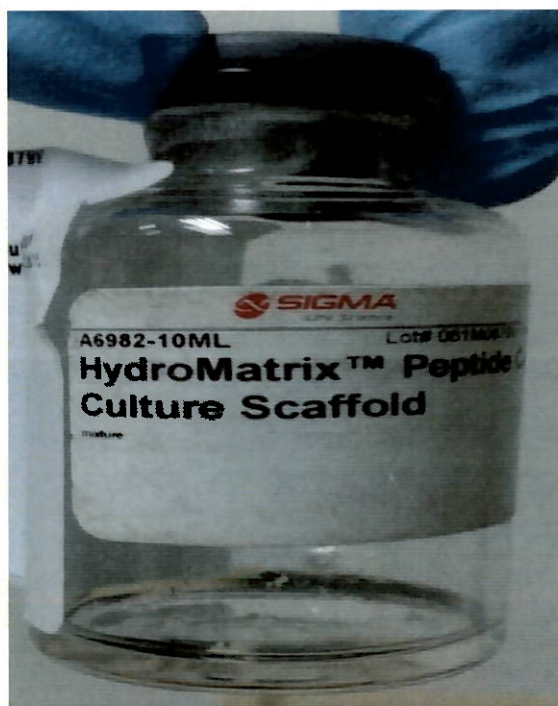
3.2 Plaqueamento do *HydroMatrix Peptide Cell Culture Scaffold*.

A matriz (ou *scaffold*) de hidrogel utilizada neste trabalho foi o *HydroMatrix Peptide Cell Culture Scaffold* - A6982, Sigma-Aldrich, Brasil (Figura 1). O boletim técnico fornece informações do produto que é constituído por peptídeos autopolimerizáveis instantâneos que formam um gel composto por uma matriz rica em nanofibras tridimensionais com aplicações em pesquisas relacionadas a engenharia de tecidos. O biomaterial adquirido apresentou-se em

um frasco contendo um pó liofilizado pronto para ser preparado com 10 mL de água estéril, formando uma solução estoque na concentração de 1%.

Para o plaqueamento, foi utilizada a solução trabalho recomendada para o cultivo celular de 0,25%, portanto foi realizada a diluição da solução estoque e posteriormente foi adicionado em cada poço na placa de 96 e de 24 poços (Costar Corning, Nova York, EUA) 75 μ L e 250 μ L da solução trabalho, respectivamente. As placas foram incubadas em estufa com 5% CO₂ a 37°C por 1 hora para que ocorresse a geleificação inicial da matriz de hidrogel no fundo dos poços. Após este período, seguiu-se com o plaqueamento celular para os testes microbiológicos e de biocompatibilidade.

Figura 1 - *HydroMatrix Peptide Cell Culture Scaffold* A6982 (Sigma-Aldrich)



Fonte: Elaborado pelo autor.

3.3 Análises de Ação Antimicrobiana

Os ensaios para a avaliação da ação antimicrobiana dos grupos A, B, C e D foram realizados sobre a cepa de referência *American Type Culture Collection* (ATCC 4083) *Enterococcus faecalis*, proveniente do Laboratório de Microbiologia e Imunologia do Curso de Odontologia do ICT – UNESP que foram mantidas em congelamento em freezer -70°C em caldo Brain Heart Infusion (BHI – Himedia, Mumbai, Índia) com 20% de glicerol. Para ativação do micro-organismo, a cepa de *E. faecalis* foi descongelada em temperatura ambiente e cultivada em meio de cultura ágar BHI (Brain Heart Infusion - Himedia, Mumbai, Índia) por 48 h a 37°C em estufa bacteriológica.

O extrato glicólico do Barbatimão 200 mg/L foi doado pela empresa Mapric (São Paulo, SP, Brasil). O laudo de análise do extrato certifica a procedência do produto, constando que a parte utilizada da planta foi a casca do *Stryphnodendron barbatiman* M., relatando ainda que por ser um produto natural pode sofrer turvação e/ou precipitação com o tempo ou quando associado a outras substâncias como etanol.

O antibiótico em cápsulas de ciprofloxacina 200 mg (isento de excipientes) foi obtido da farmácia de manipulação Nostra Fórmula (São José dos Campos, SP, Brasil). A diluição do ciprofloxacino foi realizada em água destilada estéril nas concentrações 100 µg/mL, 50 µg/mL, 25 µg/mL e 10 µg/mL para a realização dos ensaios.

3.3.1 Determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM) e Concentração Microbicida Mínima (CMM) do extrato do *S. barbatiman*

Neste experimento foi utilizado o método de microdiluição de acordo com a *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI, 2013). Para determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM) e da Concentração Microbicida Mínima (CMM) dos grupos A, B, C e D, foram utilizadas placas de 96 poços. Para a preparação do inóculo padronizado, o *E. faecalis* foi semeado por esgotamento em ágar Brain Heart Infusion (BHI) (Himedia, Mumbai, Índia). Após 24 horas de incubação em estufa bacteriológica a 37°C, as colônias foram avaliadas pela coloração de Gram e crescimento uniforme isento de contaminações. As colônias foram transferidas para um tubo contendo solução fisiológica estéril (NaCl 0,9%) e a suspensão bacteriana foi padronizada em espectrofotômetro a 10^6 células por mL, com os parâmetros de comprimento de onda de 760 nm e densidade óptica de 0,298. Na placa de 96 poços, para o grupo A foi plaqueado a matriz de hidrogel 0,25% e após o período de geleificação iniciou-se as diluições do extrato de barbatimão 200 mg/mL em meio Mueller Hinton (100 mg/mL, 50 mg/mL, 25 mg/mL e 12,5 mg/mL) e a adição da suspensão bacteriana padronizada. No grupo B, foi plaqueado a matriz de hidrogel 0,25% e seguiu-se com as diluições do ciprofloxacino em meio Mueller Hinton nas concentrações de 100 µg/mL, 50 µg/mL, 25 µg/mL e 10 µg/mL seguido da adição do micro-organismo. No grupo C foi plaqueado somente pela matriz de hidrogel com a suspensão microbiana. No grupo D foi realizado as diluições do extrato de barbatimão 200 mg/mL em meio Mueller Hinton (100 mg/mL, 50 mg/mL, 25 mg/mL e 12,5 mg/mL) e a adição do *E. faecalis*. No controle negativo foi plaqueado somente pelo meio de cultura Mueller Hinton. A placa foi levada para incubação em estufa bacteriológica a 37°C por 24 horas, após este período a leitura da placa foi realizada macroscopicamente,

determinando a CIM no poço de menor concentração que não apresentou turvação.

Após a leitura das placas, foi realizado a determinação da CMM, para isto inoculou-se por arraste em placas contendo ágar BHI, 10 μ L de cada poço da CIM. Após 48 horas de incubação em estufa bacteriológica à 37°C, foi feita a leitura das placas considerando a menor concentração que não foi observado crescimento de colônias para determinar a Concentração Microbica Mínima (CMM).

3.3.2 Avaliação da atividade antimicrobiana em biofilme de *Enterococcus faecalis*

Para a formação *in vitro* do biofilme monotípico, foi utilizado a cepa padrão de *Enterococcus faecalis* (ATCC 4083), utilizando como corpo de prova o fundo da placa de 96 poços. Para o preparo do inóculo, o micro-organismo *E. faecalis* foi plaqueado em meio sólido BHI que foi incubada por 48 horas em estufa à 37°C. A colônia isolada do *E. faecalis* foi transferida para um tubo contendo 5 mL de caldo BHI e incubado em agitação por 48 horas a 37°C e foi realizado a troca do meio em 24 horas. Após este período, verificou a turvação do meio, caracterizando o crescimento microbiológico, então o tubo foi centrifugado para a formação do *pellet* e o sobrenadante foi descartado. Para o processo de lavagem foi acrescido 3 mL de solução salina estéril que foi homogeneizado através do vórtex completo em agitador de tubos (Vision Scientific) e em seguida centrifugado, este processo foi realizado duas vezes. Para o preparo da suspensão padrão, o tubo contendo o *pellet* previamente lavado foi ressuspendido em agitador com 5 mL de solução salina estéril. Esta solução foi padronizada em espectrofotômetro na concentração de 10^7 células

por mL nos parâmetros de comprimento de onda de 760 nm e densidade óptica de 0,385.

Para os grupos composto pela matriz de hidrogel (A, B e C), primeiramente foi realizado o plaqueamento da matriz, e para isto foi acrescido 75 µL da solução 0,25% em cada poço e após o período de geleificação da matriz seguiu-se com o protocolo de formação do biofilme, portanto foi inoculado 200 µL da suspensão padronizada de células de *E. faecalis* contendo 10^7 células por mL em solução salina estéril por poço e a placa foi incubada sob agitação por 1 hora e 30 minutos à 37°C para promover a adesão inicial dos micro-organismos. Após a fase inicial de adesão, a suspensão de células foi aspirada cuidadosamente e cada poço foi lavado com salina estéril para remover as células frouxamente aderidas. Posteriormente foi acrescido 200 µL do meio líquido BHI e a placa foi incubada sob agitação por 24 horas. Passado o período de formação do biofilme, este foi colocado em contato com os outros componentes dos grupos de estudo, sendo que no grupo A, foi adicionado as diluições extrato de barbatimão 200 mg/mL em meio BHI (100 mg/mL, 50 mg/mL, 25 mg/mL e 12,5 mg/mL), no grupo B o antibiótico ciprofloxacino foi acrescido em meio BHI nas diluições 50 µg/mL, 25 µg/mL e 10 µg/mL; no grupo C foi acrescido somente o meio de cultura BHI e no grupo D foi adicionado as diluições extrato de barbatimão 200 mg/mL em meio BHI (100 mg/mL, 50 mg/mL, 25 mg/mL e 12,5 mg/mL). Foram realizados os controles da formação do biofilme sem tratamento, o controle do meio de cultura e o controle negativo com a solução salina estéril. O teste foi realizado em duplicata por um período de ação prolongada de 24 horas. Posteriormente, para a realização da leitura dos resultados por meio do ensaio de MTT, foi acrescentado 100 µL da solução de MTT (Sigma-Aldrich, Brasil) a 0,5 mg/mL em cada poço e as placas foram levadas a estufa bacteriológica a 37°C por uma hora sob proteção da luz. Após o período, a solução de MTT foi removida e adicionado 100 µL de Dimetil

Sulfóxido (DMSO, Sigma Aldrich, Brasil) para solubilização do conteúdo dos poços. As placas retornaram à incubação por 10 minutos. Após este período, a placa foi levada à agitadora orbital (Solab SL180/A) por mais 10 minutos. Posteriormente, foi feita a leitura da absorbância dos poços em espectrofotômetro (Biotek, EL808IU) empregando o comprimento de onda de 570 nm.

3.4 Análises de Biocompatibilidade

Para a determinação da biocompatibilidade, foi avaliado o comportamento dos grupos (A, B, C, D) em contato com macrófagos de camundongo (RAW 264.7), por meio do ensaio de citotoxicidade com o teste colorimétrico MTT e a genotoxicidade pelo ensaio de micronúcleo. Para o grupo B composto pelo ciprofloxacino, foi realizado os ensaios de biocompatibilidade utilizando o parâmetro de menor concentração antimicrobiana eficaz determinada nos ensaios microbiológicos. Os outros grupos foram testados da mesma maneira que nos ensaios microbiológicos.

3.4.1 Cultura celular de macrófagos (RAW 264.7)

Neste trabalho, foi utilizado a cultura de células de macrófagos originados de camundongos da linhagem RAW 264.7. Estas células foram doadas pelo Laboratório de Cultura de Células do Laboratório de Microbiologia e Imunologia da ICT – UNESP que foram obtidas do banco de células da

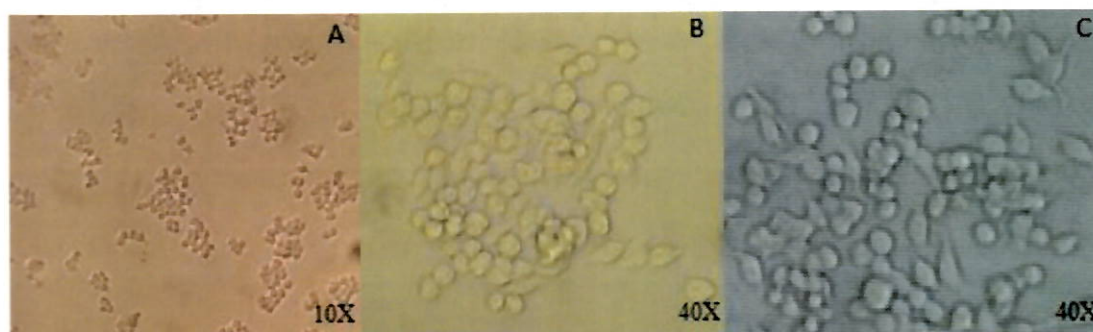
Associação Técnico Científica Paul Ehrlich (APABCAM – RJ). Para o cultivo celular, foi utilizado o meio de cultura Eagle modificado por Dulbecco (DMEM) (LGC Biotecnologia, Cotia, Brasil), suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB) (Invitrogen, Nova York, EUA) e com os antibióticos penicilina (100 U/mL) e estreptomicina (100 µg/mL), em frascos de cultivo celular (TPP, Suíça) e incubadas em estufa à temperatura de 37°C contendo 5% de CO₂. O meio de cultura foi trocado a cada 48 horas. Em todas as etapas do cultivo as células (Figura 2) foram observadas em microscópio com luz invertida (Microscópio Carl Zeiss Microlimaging GmbH – Axiovert 40C, Germany).

Foram realizados subcultivos celulares quando atingido a subconfluência das células, caracterizado pela ocupação de mais de 85% do frasco. Para os subcultivos e plaqueamentos, os frascos foram lavados com o próprio meio e o sobrenadante descartado para remover células mortas ou frouxamente aderidas, então foi adicionado o meio de cultura e as células foram removidas com auxílio de um varredor celular (TPP, Suíça) e a suspensão de células foi transferida para um tubo tipo Falcon (TPP, Suíça) e centrifugado durante cinco minutos a 3.000 rpm a 25°C (Centrífuga Labnet, USA). Após a centrifugação, verificou-se a formação do *pellet* celular e o sobrenadante foi desprezado e as células foram ressuspensas em 10 mL de meio de cultura e transferidas para um novo frasco de cultivo celular no caso de subcultivo ou foi realizado a padronização da suspensão celular para o plaqueamento. Para a contagem celular foi transferida uma alíquota de 50 µL da suspensão celular em um *ependorf* e foi acrescido 5 µL de corante azul de Trypan 0,5% (Sigma-Aldrich) agitando com a micropipeta e foi transferido 10 µL da mistura para a câmara de Neubauer (Optik Labor) e a contagem de células viáveis foi realizada considerando as células não coradas pelo azul de Trypan, pois as células com coloração azul incorporaram o corante em seu citoplasma devido a rupturas em sua membrana, portando não são consideradas viáveis. Para a contagem foi utilizada a média do número de

células dos quadrantes laterais da câmara de Neubauer multiplicada por 10^4 para determinar a quantidade de células em 1 mL da suspensão, como o *pellet* foi ressuspensionado em 10 mL foi necessário multiplicar esse número por 10 para determinar o número aproximado de células. Foi realizada uma diluição da suspensão celular considerando a proporção de células necessárias para o plaqueamento e foi adicionado meio de cultura suficiente para que em cada poço na placa de 96 poços tivesse 8×10^3 células em 200 μL de meio de cultura e que na placa de 24 poços tivesse 2×10^4 células em 1 mL de meio de cultura.

O restante das células foram ressuspensas em meio de cultura contendo 10% de Dimetil Sulfoxido (DMSO) - Sigma Aldrich e transferidas para criotubos 2 mL da suspensão com cerca de 1×10^6 células, que foram levadas ao congelamento a -70°C por 24 horas e posteriormente congeladas em nitrogênio líquido.

Figura 2 – Cultivo celular macrófagos de camundongos (RAW 264.7)



Legenda: a) Células após o descongelamento; b) Células após 24 horas de cultivo; Células após 48 horas de cultivo.

Fonte: Elaborado pelo autor.

3.4.2 Citotoxicidade – Ensaio de MTT

Para o teste de citotoxicidade foi utilizado um método colorimétrico empregando o sal MTT (brometo de 3 (4,5-dimetiltiazol-2-yl) 2,5-difeniltetrazólio) que é degradado por enzimas redutases presentes somente em células viáveis que transformam a coloração amarelada do MTT em uma substância de coloração roxa denominado formazan e pode ser quantificado por espectrofotometria. Foi realizado o plaqueamento da matriz de hidrogel na placa de 96 poços respeitando a disposição dos grupos, para isto foi acrescido 75 μL da solução 0,25% da matriz de hidrogel por poço e após o período de 1 hora para a geleificação foi realizado o plaqueamento celular. Neste ensaio uma quantidade de 8×10^3 células foram colocadas em cada poço na placa de 96 poços e incubadas em estufa por 24 horas à 37°C com 5% CO_2 para a aderência celular. Após este período, o meio foi trocado e as culturas celulares foram expostas aos grupos de estudo e aos controles negativo (sem células) e controle positivo (com células) e incubadas em estufa com 5% CO_2 a 37°C por 24 horas. Após o tratamento, as placas foram lavadas três vezes com 200 μL de PBS estéril para descartar células mortas e resíduos. Após a lavagem, foi acrescentado 100 μL da solução de MTT (Sigma-Aldrich, Brasil) a 0,5 mg/mL em cada poço. As placas foram cobertas com papel alumínio e levadas a estufa por uma hora, sob temperatura de 37°C e 5% de CO_2 . Após o período, a solução de MTT foi removida e adicionado 100 μL de Dimetil Sulfóxido (DMSO, Sigma Aldrich, Brasil) para solubilização do conteúdo dos poços. As placas envolvidas em papel alumínio retornaram à incubação por 10 minutos. Após este período, as placas foram levadas à agitadora orbital (Solab SL180/A) por mais 10 minutos. Posteriormente, foi feita a leitura da absorbância dos poços em espectrofotômetro (Biotek, EL808IU) empregando o comprimento de onda de

570 nm. A citotoxicidade foi expressa como a porcentagem em relação ao grupo controle (=100%), sendo considerado citotóxico quando a viabilidade celular for (<50%). Esse teste foi realizado em duplicata.

3.4.3 Genotoxicidade – Ensaio de Micronúcleo

O ensaio de micronúcleo consiste na visualização de um pequeno núcleo acoplado ao núcleo verdadeiro que surge a partir do deslocamento de fragmentos de cromossomo do núcleo principal, estes micronúcleos surgem por alterações genéticas espontâneas ou são induzidos por agentes genotóxicos. Neste estudo, foi realizado primeiramente o plaqueamento da matriz de hidrogel na placa de 24 poços respeitando a disposição dos grupos, para isto foi acrescido 250 µL da solução 0,25% da matriz de hidrogel por poço e após o período de 1 hora para a geleificação. Em seguida foi realizado o plaqueamento celular com 1 mL de meio de cultura para 20.000 células por poço e foram mantidas em estufa com atmosfera úmida contendo 5% de CO₂ por 24 horas. Após este período foi trocado o meio de cultura e as células foram tratadas respeitando a disposição dos grupos A, B, C e D e foram mantidas em estufa por mais 24 horas (37°C, 5% de CO₂). Após o tratamento cada poço foi lavado com 1 mL PBS estéril e foi adicionado 500 µL da solução fixadora de formol 4% (Sigma-Aldrich) por 10 minutos, após a fixação, os poços foram lavados com 1 mL de PBS e em seguida foram adicionados 200 µL de PBS e uma gota de *fluoroshield with DAPI* (Sigma-Aldrich) e agitados em mesa orbital (Solab) por 5 minutos sob proteção da luz. Para a realização da leitura foi utilizado o microscópio de fluorescência (Axiovert 200, Zeiss, Jena, Alemanha) e foi verificada a frequência de micronúcleos em cada 2.000 células contadas.

4 RESULTADO

4.1 Concentração Inibitória Mínima (CIM) e Concentração Microbicida Mínima (CMM) do extrato do *Stryphnodendron barbatiman*

Os resultados para determinação da concentração inibitória mínima, conforme a tabela 1, demonstraram que todas as diluições o grupo A apresentaram turvação, que podem ser decorrentes do crescimento microbiano ou da interação do extrato com o meio, portanto não foi possível determinar a CIM do extrato de barbatimão associado a matriz de hidrogel nas concentrações testadas sobre *E. faecalis* na sua forma planctônica. No grupo B, não foi observada turvação em todas as diluições, determinado a CIM de 10 µg/mL para o ciprofloxacino sobre *E. faecalis* dentre as concentrações testadas neste experimento. No grupo C ocorreu o crescimento microbiano, determinando que não houve ação antimicrobiana com a matriz de hidrogel isolada. No grupo D, todas as diluições apresentaram turvação devido as características do extrato, não sendo possível determinar a CIM do extrato de barbatimão nas concentrações testadas sobre *Enterococcus faecalis*. No controle negativo composto somente pelo meio de cultura Mueller Hinton, não houve crescimento bacteriológico, excluindo a possibilidade da contaminação do meio por micro-organismos.

Para a determinação da concentração microbicida mínima (CMM), o grupo A todas as diluições foram testadas para determinar se a causa da turvação foi decorrente do crescimento microbiano ou da interação do meio com o extrato, portanto foi realizado o plaqueamento por arraste das quatro concentrações testadas (100 mg/mL, 50 mg/mL, 25 mg/mL e 12,5 mg/mL) e após 48 horas de incubação em estufa bacteriológica a 37°C, o resultado da

leitura determinou que a concentração microbicida mínima (CMM) do extrato de barbatimão associado a matriz hidrogel foi de 12,5 mg/mL para *E. faecalis*. No grupo B não houve crescimento bacteriano em nenhuma concentração da matriz de hidrogel associada com as diluições do ciprofloxacino em meio Mueller Hinton (100 µg /mL, 50 µg /mL, 25 µg/mL e 10 µg/mL) determinando a CMM de 10 µg/mL para o ciprofloxacino sobre *E. faecalis*. No grupo C ocorreu o crescimento microbiano, comprovando a ausência da ação antimicrobiana da matriz de hidrogel sobre o *E. faecalis*. No grupo D foi realizado o plaqueamento por arraste das quatro concentrações do extrato de barbatimão isolado testadas (100 mg/mL, 50 mg/mL, 25 mg/mL e 12,5 mg/mL) e após 48 horas de incubação em estufa bacteriológica a 37°C, o resultado da leitura determinou que a concentração microbicida mínima (CMM) do extrato de barbatimão foi de 12,5 mg/mL para *E. faecalis* (Figura 3).

Tabela 1 - Resultados do CIM para os grupos experimentais e controle.

GRUPO	DESCRIÇÃO	CONCENTRAÇÃO	RESULTADO
Grupo A	Matriz de hidrogel + Barbatimão	100 mg/mL	Ocorreu turvação em todas as concentrações
		50 mg/mL	
		25 mg/mL	
		12,5 mg/mL	
Grupo B	Matriz de hidrogel + Ciprofloxacino	100 µg/mL	Não ocorreu turvação em nenhuma concentração CIM = 10 µg/mL
		50 µg/mL	
		25 µg/mL	
		10 µg/mL	
Grupo C	Matriz de hidrogel	0,25%	Ocorreu turvação
Grupo D	Barbatimão	100 mg/mL	Ocorreu turvação em todas as concentrações
		50 mg/mL	
		25 mg/mL	
		12,5 mg/mL	

Fonte: Elaborado pelo autor.

Tabela 2 - Resultados do CMM para os grupos experimentais e controle.

GRUPO	DESCRIÇÃO	CONCENTRAÇÃO	RESULTADO
Grupo A	Matriz de hidrogel + Barbatimão	100 mg/mL	Não houve crescimento na concentração 12,5 mg/mL. CMM = 12,5 mg/mL
		50 mg/mL	
		25 mg/mL	
		12,5 mg/mL	
Grupo B	Matriz de hidrogel + Ciprofloxacino	100 µg/mL	Não houve crescimento em nenhuma das concentrações. CMM = 10 µg/mL
		50 µg/mL	
		25 µg/mL	
		10 µg/mL	
Grupo C	Matriz de hidrogel	0,25%	Ocorreu turvação
Grupo D	Barbatimão	100 mg/mL	Não houve crescimento na concentração 12,5 mg/mL. CMM = 12,5 mg/mL
		50 mg/mL	
		25 mg/mL	
		12,5 mg/mL	

Fonte: Elaborado pelo autor.

Figura 3 - CMM do extrato de barbatimão sobre *E. faecalis*



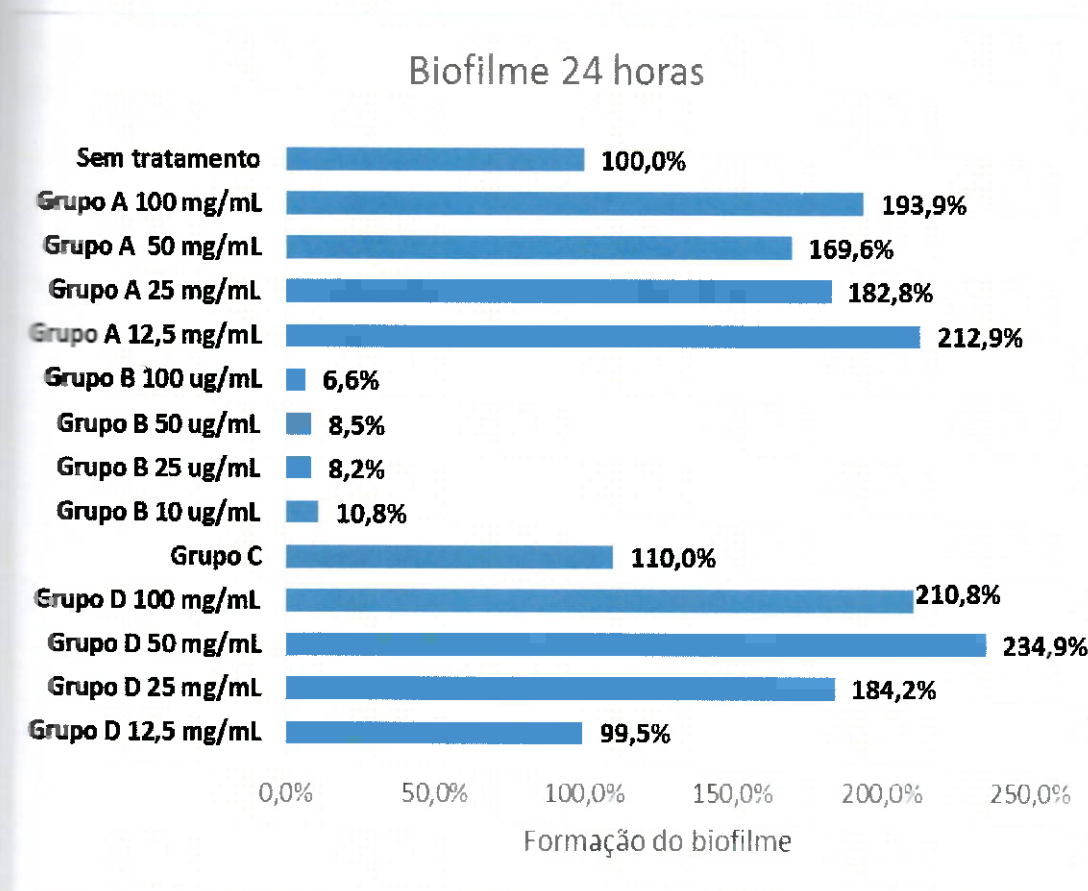
Legenda: Concentrações: 1=100 mg/mL; 2 = 50 mg/mL; 3=25 mg/mL; 4=12,5 mg/mL.

Fonte: Elaborado pelo autor.

4.2 Ação antimicrobiana em biofilme *E. faecalis*

Os resultados demonstram (Figura 4) que as diluições do extrato de barbatimão associado ou não a matriz de hidrogel (Hidromatrix) não tiveram atividade antimicrobiana sobre o biofilme de *E. faecalis* e ainda favoreceram o desenvolvimento do biofilme no tratamento realizado por 24 horas do biofilme de *E. faecalis*, como demonstram o gráfico abaixo. Pode-se observar que houve uma atividade antimicrobiana efetiva com o antibiótico ciprofloxacino.

Figura 4 – Gráfico do biofilme do *E. faecalis* tratado por 24 horas



Fonte: Elaborado pelo autor.

4.3 Citotoxicidade – Ensaio de MTT

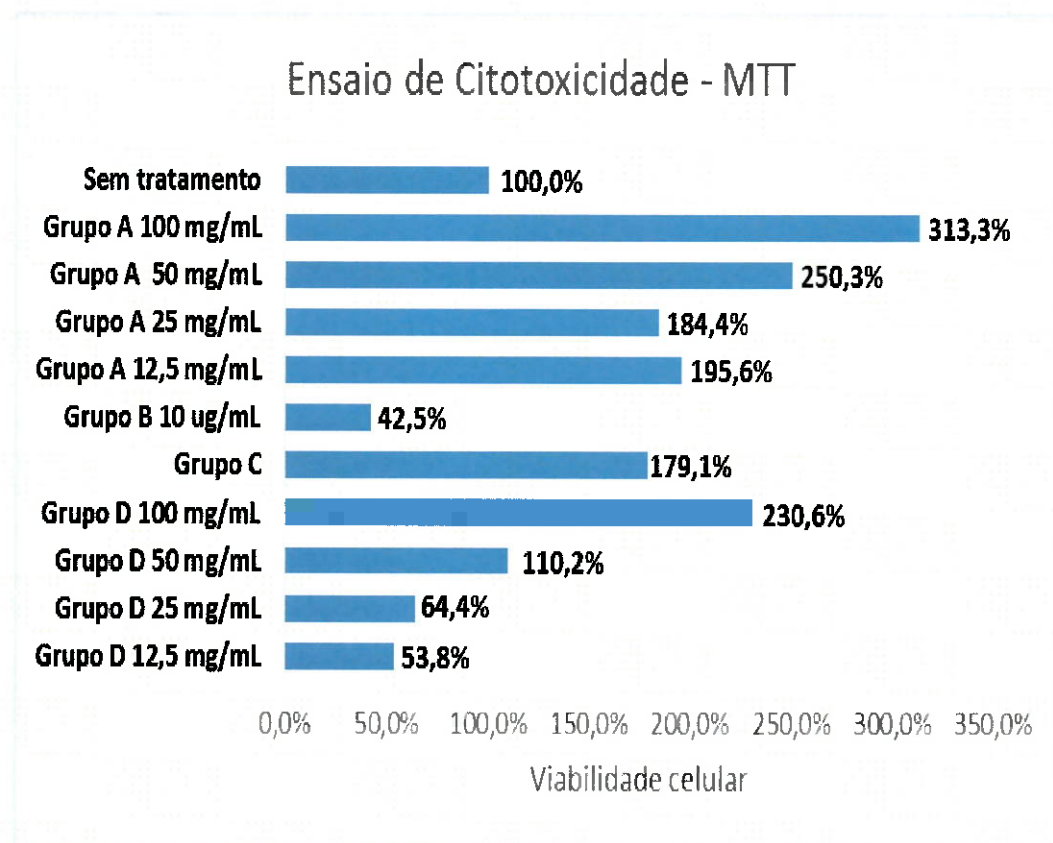
Os resultados do ensaio de viabilidade celular (Figura 5) demonstraram que as diluições do extrato de barbatimão associado ou não a matriz de hidrogel não foram citotóxicos nas concentrações 100 mg/mL, 50 mg/mL, 25 mg/mL e 12,5 mg/mL enquanto que o ciprofloxacino foi citotóxico na concentração de 10 µg/mL.

O grupo A promoveu proliferação celular em todas as diluições testadas,

sendo significante em relação ao grupo controle ($p < 0,05$). O grupo C exibiu uma alta proliferação celular, significante em relação ao controle ($p < 0,05$).

No grupo D houve aumento da proliferação celular apenas nas concentrações 100 mg/mL e 50 mg/mL.

Figura 5 – Gráfico do ensaio de Citotoxicidade realizado por ensaio de MTT sobre macrófagos RAW



Fonte: Elaborado pelo autor.

4.4 Ensaio de genotoxicidade

Os resultados do ensaio de genotoxicidade demonstraram que o ciprofloxacino (10 µg/mL) foi altamente genotóxico para as células, exibindo uma quantidade de aproximadamente 10 vezes mais micronúcleos que o grupo controle (Tabela 3) ($p < 0,05$).

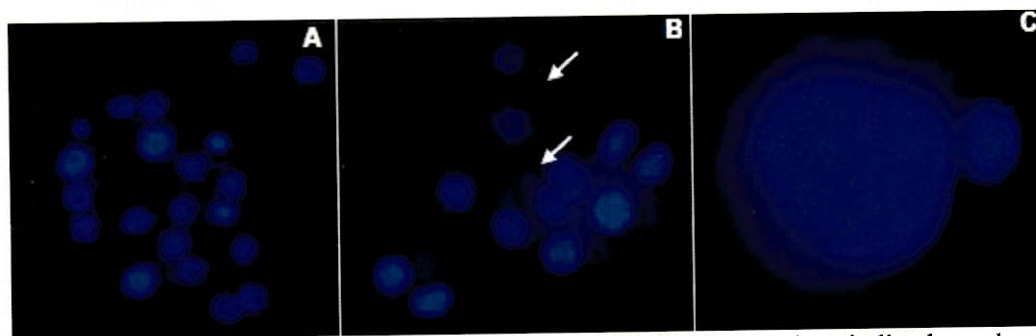
Foi verificado que os grupos A, C e D apresentaram formação de micronúcleos semelhante ao grupo controle, não sendo considerados genotóxicos. As imagens do ensaio de micronúcleo foram ilustradas na figura 6.

Tabela 3 - Média do número de micronúcleos encontrados em 2.000 células

Grupos		Média de Micronúcleos
Grupo A	Hidromatrix + barbatimão	12
Grupo B	Ciprofloxacino 10 µg/mL	66
Grupo C	Matriz de hidrogel (Hidromatrix)	9
Grupo D	Barbatimão 100 mg/mL	10
Controle positivo	EMS	68
Controle	Somente células	6

Fonte: Elaborado pelo autor.

Figura 6 - Núcleos corados pelo corante de fluorescente DAPI



Legenda: (A) sem presença de micronúcleos; (B) presença de dois micronúcleos indicados pelas setas; (C) Núcleo e Micronúcleo (60X).

Fonte: Elaborado pelo autor.

5 DISCUSSÃO

No presente estudo verificou-se que os resultados da concentração inibitória mínima (CIM) para os grupos contendo extrato de barbatimão não foram possíveis de determinar devido a turvação de todas as concentrações testadas. Desta forma, a inibição do crescimento bacteriano proporcionada pelas diferentes concentrações foi avaliada pela concentração bactericida mínima (CMM), indicada pela presença ou ausência de crescimento bacteriano. Assim, a CMM para *E. faecalis* foi 12,5 mg/mL para os grupos contendo barbatimão. Para o antibiótico ciprofloxacino observou-se uma alta atividade antimicrobiana, exibindo CIM e CMM de 10 µg/mL.

Souza *et al.* (2007), verificaram também que não foi possível a identificação do CIM do extrato de barbatimão, uma vez que a coloração deste extrato impediu a visualização de presença de turvação. Desta forma, a CMM para *S. aureus* foi de 50 mg/mL e para *S. epidermidis* e *E. coli* foi de 75 mg/mL. Em contrapartida, no estudo de Soares SP *et al.* (2008) foi avaliada a atividade antibacteriana do extrato hidroalcoólico de barbatimão sobre micro-organismos

importantes para odontologia por meio da microdiluição em caldo em um faixa de diluição menor do que a realizada neste presente estudo, e os resultados demonstraram que o extrato de barbatimão apresentou atividade antimicrobiana para todos micro-organismos testados e determinaram a concentração inibitória mínima do extrato hidroalcoólico do barbatimão de 400 µg/mL para o *E. faecalis*, *Streptococcus salivarius*, *Streptococcus mutans*, *Streptococcus sanguinis*, *Streptococcus sobrinus* e de 350 µg/mL para *Streptococcus mitis* e *Lactobacillus casei*.

A presença de coloração do extrato de barbatimão pode ter influenciado na visualização da turvação dos poços, uma vez que este extrato possui tanino em sua composição. Sabe-se que os taninos condensados ou proantocianidinas são estruturas fenólicas muito reativas quimicamente que podem formar pontes de hidrogênio, ligações intra e intermoleculares com diversas substâncias, além de possuírem propriedades adstringentes capazes de precipitar proteínas transformando-as em substâncias insolúveis, e ainda são compostos facilmente oxidáveis o que ocasiona a alteração de coloração em soluções ricas em taninos que apresentam pigmentos avermelhados, portanto alterações na aparência do extrato podem ocorrer em decorrência da natureza química do extrato (Monteiro *et al.*, 2005).

Neste estudo, verificou-se que o biofilme de *E. faecalis* foi altamente resistente à ação do extrato de barbatimão associado ou não à matriz de hidrogel. Ao contrário do que se esperava, os grupos contendo barbatimão causaram aumento da proliferação de biofilme não possuindo atividade antimicrobiana nas concentrações avaliadas neste estudo. Já, o antibiótico ciprofloxacino foi capaz de induzir a diminuição significativa na formação de biofilme monotípico de *E. faecalis*. Em outro estudo, foi avaliado os efeitos das frações de barbatimão (F2 e subfração F2.4) em *C. albicans* em suspensão planctônica e em biofilme comparado com a anfotericina B e fluconazol. Por meio dos testes de

microdiluição em caldo, viabilidade celular MTT e cristal violeta, verificaram que os resultados das frações do *S. adstringens* foi comparável aos antifúngicos anfotericina B e fluconazol, concluíram que as frações de barbatimão inibiram o crescimento *C. albicans* planctônico e biofilme (Luiz *et al.*, 2015).

Além da atividade antimicrobiana, é importante também a avaliação de fitoterápicos sobre as células, objetivando avaliar suas propriedades de biocompatibilidade. Desta forma, neste presente estudo foi observado que a associação da matriz de hidrogel com o extrato de barbatimão promoveu uma alta proliferação de macrófagos (RAW 264.7), maior que 100% em todas as concentrações testadas. Somente a matriz de hidrogel também foi capaz de induzir alta proliferação celular e as concentrações isoladas do extrato de barbatimão também não foram citotóxicas para as células.

Em contrapartida, o antibiótico ciprofloxacino que apresentou alta atividade antimicrobiana, foi citotóxico para as células, exibindo diminuição da proliferação celular.

Neste estudo, a genotoxicidade foi avaliada por meio do ensaio de micronúcleos, e os resultados demonstraram que não houve genotoxicidade dos grupos contendo o extrato de barbatimão. Em concordância, Santos Filho *et al.* (2011) avaliaram as propriedades antigenotóxicas e antioxidantes do extrato aquoso e etanólico do barbatimão, demonstrando que tanto o extrato aquoso quanto o etanólico possuem atividade antioxidante e promoveram a inibição da genotoxicidade induzida pela ciclofosfamida pela diminuição significativa da formação de micronúcleos. Ainda o extrato aquoso inibiu o dano ao DNA, concluindo que os efeitos benéficos do extrato de barbatimão sugerem sua ação como anticancerígeno. Costa MA *et al.* (2010) avaliaram a atividade mutagênica do extrato de barbatimão por meio do ensaio de micronúcleos. Grupos de dez animais foram tratados por via oral com 750, 1500, 2250 mg/kg do extrato de barbatimão e o controle positivo com ciclofosfamida, após 24 horas do

tratamento, os animais foram sacrificados e foram extraídos os eritrócitos para a realização do ensaio de micronúcleo. Os resultados mostram que não houve efeito mutagênico em células da medula óssea de camundongos e que o fitoterápico apresentou efeito antimutagênico na dose de 750 mg/kg.

No presente estudo, foi verificado que o antibiótico ciprofloxacino foi genotóxico para as células, demonstrando seu potencial mutagênico e desta maneira deve ser utilizado com cautela.

Diante deste exposto é importante novas pesquisas que avaliem a atividade antimicrobiana do extrato de barbatimão utilizando mais concentrações e diferentes micro-organismos.

As limitações deste estudo são que os resultados *in vitro* podem não refletir o que aconteceria em situações *in vivo*, no entanto pode servir de um parâmetro inicial. Além disso, os extratos fitoterápicos podem sofrer variação química quantitativa e qualitativa as quais podem ocorrer diante de fatores que implicam sua colheita, diferentes formas de extração e as diferentes partes utilizadas da planta. A dificuldade na padronização dos componentes do extrato natural pode influenciar diretamente na atividade biológica podendo gerar diferentes resultados.

Ainda, cabe salientar que a associação da matriz de hidrogel com o extrato de *Stryphnodendron barbatiman*, demonstrou *in vitro* um resultado excelente com relação a viabilidade celular, sugerindo pesquisas futuras para confirmação de uma possível ação na proliferação celular e regeneração tecidual.

6 CONCLUSÃO

Conclui-se que o extrato de barbatimão associado ou não a matriz de hidrogel apresentou uma baixa atividade antimicrobiana sobre *E. faecalis*. Em contrapartida, esta associação causou alta proliferação de macrófagos e não apresentou potencial genotóxico.

REFERÊNCIAS*

Barbanti SH, Zavaglia CA, Duek EA. Polímeros bioreabsorvíveis na engenharia de tecidos. *Polímeros*. 2005;(15):5-19.

Borges FA, Siguematsu PR, Herculano RD, Santos C. Novel sustained-release of *Stryphnodendron obovatum* leaves extract using natural rubber latex as carrier. *Rev Ciênc Farm Básica Apl*. 2015;36(3):379-84.

Bottino MC, Kamocki K, Yassen GH, Platt JA, Vail MM, Ehrlich Y, et al. Bioactive nanofibrous scaffolds for regenerative endodontics. *J Dent Res*. 2013;92(11):963-9.

Chaves DA, Lemes SR, Araujo LA, Sousa MA, Freitas GB, Lino-Junior RS, et al. Avaliação da atividade angiogênica da solução aquosa do barbatimão (*Stryphnodendron adstringens*). *Rev Bras Plantas Med*. 2016;18:524-30.

Cordeiro MM, Dong Z, Kaneko T, Zhang Z, Miyazawa M, Shi S, et al. Dental pulp tissue engineering with stem cells from exfoliated deciduous teeth. *Int J Endod*. 2008;34(8):962-9.

Costa RG, Oliveira JE, Paula GF, Picciani PH, Medeiros ES, Ribeiro C, et al. Eletrofição de Polímeros em Solução. Parte I: Fundamentação Teórica. *Polímeros*. 2012;22(2):170-7.

Costa MA, Ishida K, Kaplum V, Koslyk ED, Mello JC, Nakamura T, et al. Safety evaluation of proanthocyanidin polymer-rich fraction obtained from stem bark of *Stryphnodendron adstringens* (Barbatimão) for use as a pharmacological agent. *Regul Toxicol Pharmacol*. 2010;58:330-5.

Costa MA, Mello JC, Kaneshima EN, Ueda-Nakamura T, Benedito Filho P, Audi EA, et al. Acute and Chronic Toxicity of an Aqueous Fraction of the Stem Bark of *Stryphnodendron adstringens* (Barbatimão) in Rodents. *Evid Based Complement Alternat Med*. 2013;1-9.

* 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

Clinical and Laboratory Standards Institute. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing [M100-S23]. 23. ed. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute; 2013.

Dahlén G, Blomqvist S, Almstahl A, Carlén A. Virulence factors and antibiotic susceptibility in Enterococci isolated from oral mucosal and deep infections. J Oral Microbiol. 2012;4:1-7.

Drury JL, Mooney DJ. Hydrogels for tissue engineering scaffold design variables. Biomaterials. 2003;(24):4337-51.

Endo MS, Ferraz CC, Zaia AA, Almeida JF, Gomes BP. Quantitative and qualitative analysis of microorganisms in root-filled teeth with persistent infection: Monitoring of the endodontic retreatment. Eur J Dent. 2013;7(3):302-9.

Feng K, Sun H, Bradley MA, Dupler EJ, Giannobile W, Ma X. Novel Antibacterial Nanofibrous PLLA Scaffold. J Control Release. 2010;146(3):363-9.

Ferrari PH, Bombana AC. A infecção Endodôntica e sua Resolução. São Paulo: Santos; 2010.

Ferreira EC, Silva JLL, Souza RF. As propriedades medicinais e bioquímicas da planta *Stryphnodendron adstringens* “barbatimão”. Biol & Saúde. 2013;11(3):14-32.

Janjić K, Cvikl B, Moritz A, Agis A. Dental pulp regeneration. Int J Stomatol Occlusion Med. 2016;8(Suppl 1):1-9.

Jorge AO. Microbiologia e Imunologia Oral. Rio de Janeiro: Elsevier; 2012.

Jorge AO. Princípios de Microbiologia e Imunologia. São Paulo: Santos; 2006.

Leal SC. Células-tronco derivadas de polpa dentária humana: propriedades e perspectivas. Rev Dental Press Ortodon Ortopi Facial. 2007;(12)4:17-8.

Lima CR, Silva LA, Rabelo RE, Vulcani VA, Assis BM, Lopes WD, et al. Cremes de barbatimão e quitosana como adjuvantes na cicatrização feridas cutâneas em coelhos. Semina Cien Agrar 2016;37(3):1317-26.

- Luiz RL, Vila TV, Mello JC, Nakamura CV, Rozental S, Ishida K. Proanthocyanidins polymeric tannin from *Stryphnodendron adstringens* are active against *Candida albicans* biofilms. BMC Complement Altern Med. 2015;15:68.
- Melo JO, Endo TH, Amado LE, Svidzinski AE, Baroni S, Mello JC, et al. Effect of *Stryphnodendron adstringens* (barbatimão) bark on animal models of nociception. RBCF. 2007;(43)3:465-9.
- Monteiro JM, Albuquerque UP, Araújo EL. Taninos: uma abordagem da química à ecologia. Quim Nova 2005;(28)5:892-6.
- Nascimento MW, Verissimo RC, Bastos ML, Bernardo TH. Medicinal plants indications from herbal healers for wound treatment. [internet]. Rev Eletr Enf. 2016 [acesso em 2016 Nov 10];18:e1152. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.5216/ree.v18.31143>.
- Oliveira JR, Castro VC, Vilela PG, Camargo SE, Carvalho CA, Jorge A, et al. Cytotoxicity of Brazilian plant extrats against oral microorganism of interest to dentistry. BMC Complement Altern Med. 2013;(13):208.
- Passaretti T, Guarnieri AP, Filipini R, Alves BC, Fonseca FL. Effective use of Barbatiman (*Stryphnodendron barbatiman*) in the healing process of lesions: a literature review. ABCS Health Sci. 2016; 41(1):51-4.
- Popat k. Nanotechnology in tissue and regenerative medicine. Boca Ratom: CRC Press; 2011.
- Rosa V, Bona A, Cavalcanti B, Nör J. Tissue engineering: from research to dental clinics. Dent Mater, 2012;28(4):341–8.
- Ruckh TT, Oldinski RA, Carroll DA, Mikhova K, Bryers JD, Popat KC. Antimicrobial effects of nanofiber poly(caprolactone) tissue scaffolds releasing rifampicin. J Mater Sci Mater Med. 2012;23(6):1411–20.
- Santos Filho PR, Ferreira LA, Gouvêa CM. Protective action against chemical-induced genotoxicity and free radical scavenging activities of *Stryphnodendron adstringens* ("barbatimão") leaf extracts. Rev. Bras. Farmacogn. 2011;21(6):1000-5.

Santos VR, Gomes R, Oliveira RR, Cortés ME, Brandão MG. Susceptibility of oral pathogenic microorganisms to aqueous and ethanolic extracts of *Stryphnodendron adstringens* (barbatimão). Int J Dent. 2004;8(1):1-5

Soares AP, Knop LA, Jesus AA, Araújo TM. Células-tronco em Odontologia. R Dental Press Ortodon Ortop Facial. 2007;(12):33-40.

Soares SP, Vinholisa AH, Casemiro LA, Silva ML, Cunha WR, Martins CH. Atividade antibacteriana do extrato hidroalcoólico de *Stryphnodendron adstringens* sobre microorganismos da cárie dental. Rev Odonto Ciênc. 2008; 23(2):141-4.

Souza TM, Moreira RR, Pietro RC, Isaac VL. Avaliação da atividade anti-séptica de extrato seco de *Stryphnodendron adstringens* (Mart.) Coville e de preparação cosmética contendo este extrato. Braz J Pharmacogn. 2007; 17(1):71-5.

34