



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

FABIA LUGLI SPER

**ATIVIDADE ANTIMICROBIANA, ANTI-INFLAMATÓRIA,
CITOTOXICIDADE E GENOTOXICIDADE DO EXTRATO GLICÓLICO
DE *Stryphnodendron barbatiman* (VELL.) MART. (BARBATIMÃO)**

2018

FABIA LUGLI SPER

**ATIVIDADE ANTIMICROBIANA, ANTI-INFLAMATÓRIA, CITOTOXICIDADE E
GENOTOXICIDADE DO EXTRATO GLICÓLICO DE *Stryphnodendron*
barbatiman (VELL.) MART. (BARBATIMÃO)**

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. Luciane Dias de Oliveira

São José dos Campos

2018

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).

Sper, Fabia Lugli

Atividade antimicrobiana, anti-inflamatória, citotoxicidade e genotoxicidade do extrato glicólico de *Stryphnodendron barbatiman* (Vell.) Mart. (Barbatimão) / Fabia Lugli Sper. - São José dos Campos : [s.n.], 2018. 60 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, 2018.

Orientador: Luciane Dias de Oliveira.

1. Bactérias anaeróbias. 2. *Stryphnodendron barbatiman*. 3. Citotoxicidade. 4. Genotoxicidade. 5. Anti-inflamatório. I. Oliveira, Luciane Dias de , 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. Luciane Dias de Oliveira (Orientador)

Universidade Estadual Paulista (Unesp)

Instituto de Ciência e Tecnologia

Campus de São José dos Campos

Dr. Jônatas Rafael de Oliveira

Profa. Adj. Luana Marotta Reis de Vasconcellos

Universidade Estadual Paulista (Unesp)

Instituto de Ciência e Tecnologia

Campus de São José dos Campos

São José dos Campos, 23 de abril de 2018.

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. Luciane Dias de Oliveira e do vice-coordenador Prof. Adj. Mauro Pedrine Santamaria.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - CAPES pela concessão da bolsa de mestrado.

A todos os funcionários que de direta ou indiretamente contribuíram para a realização deste trabalho.

À professora Adj. Luciane Dias de Oliveira pela orientação, por todo conhecimento transmitido e pela paciência nos meus momentos de mil questionamentos e inconformações. Muito obrigada!

À professora Adj. Luana Marotta Reis de Vasconcellos por ter participado das bancas do meu EGQ e da minha defesa contribuindo para a minha formação e aperfeiçoamento do meu trabalho. Obrigada!

Ao professor Dr. Jônatas Rafael de Oliveira que poderia estar no parágrafo abaixo, mas além de amigo, ainda aceitou colaborar mais com a minha formação fazendo parte das bancas do meu EGQ e da minha defesa. Muito obrigada!

A todos os colegas do curso de mestrado. Seria impossível não agradecer especialmente a alguns que além de dividirem o fluxo, a câmara de anaerobiose, aprendizados e conhecimentos, dividiram um pouco das suas vidas comigo: ao Leandro Wagner Figueira, à Isabela Amêndola, ao Lucas de Paula Ramos, à Juliana Guimarães dos Santos, à Damara da Silva Avila, à

Nádia Domingues e ao Cristhian Reynaldo Gomez Bautista. Vocês tornaram tudo mais divertido! Obrigada!

Ao aluno de Iniciação Científica, Eduardo Tavares de Freitas.

À professora Dra. Graziella Nuernberg Back Brito por ter me trazido para a Unesp.

Ao professor Dr. Claudemir de Carvalho por todos os conselhos e apoio ao longo de todos esses anos.

A todos os meus professores da Faculdade de Pindamonhangaba pelos conhecimentos transmitidos e incentivo na realização do mestrado.

À minha família por todo o apoio.

"A vida é igual andar de bicicleta. Para manter o equilíbrio é preciso se manter em movimento". Albert Einstein

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS	8
RESUMO.....	10
ABSTRACT	11
1 INTRODUÇÃO	12
2 PROPOSIÇÃO	19
3 MATERIAL E MÉTODOS.....	20
3.1 Extrato vegetal.....	20
3.2 Análises fitoquímicas.....	20
3.2.1 Teor de sólidos solúveis em etanol	20
3.2.2 Determinação do teor de fenóis totais.....	21
3.2.3 Determinação do teor de flavonoides totais expressos em quercetina ...	21
3.2.4 Avaliação da atividade antioxidante	21
3.3 Bactérias anaeróbias.....	22
3.4 Atividade antimicrobiana sobre culturas planctônicas.....	22
3.5 Atividade antimicrobiana sobre biofilmes.....	24
3.6 Cultivo das células	26
3.7 Análise de citotoxicidade por teste de MTT	26
3.8 Análise de genotoxicidade por teste de micronúcleos (MN)	28
3.9 Avaliação da atividade anti-inflamatória	30
3.10 Análise estatística	31
4 RESULTADOS.....	32
4.1 Análise fitoquímica.....	32
4.1.1 Teores de sólidos solúveis em etanol, fenóis e flavonoides totais	32
4.1.2 Atividade antioxidante	32
4.2 Atividade antimicrobiana sobre culturas planctônicas.....	33
4.2.1 Concentração Inibitória Mínima (CIM)	33
4.2.2 Concentração Bactericida Mínima (CBM).....	34
4.3 Atividade antimicrobiana do extrato sobre biofilmes	34
4.4 Citotoxicidade do extrato.....	38
4.5 Genotoxicidade do extrato	40

4.6 Atividade anti-inflamatória do extrato	43
5 DISCUSSÃO	46
6 CONCLUSÃO	53
REFERÊNCIAS.....	54
ANEXO.....	60

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Microdiluição do extrato glicólico de <i>S. barbatiman</i> (Vell.) Mart. em caldo Brucella suplementado com 1% de hemina, 1 % de menadiona e 5% de sangue desfibrinado estéril de carneiro.....	23
Figura 2– Placa de ágar Brucella com 20 µl de cada concentração para definição da CBM.....	24
Figura 3 – Placa de ágar Brucella para contagem das colônias e determinação da concentração em UFC/mL.....	25
Figura 4 – Esquema do teste de MTT	28
Figura 5 – Detalhe de um Micronúcleo - estrutura de DNA contida no citoplasma claramente separado do núcleo principal, cercado por uma membrana nuclear e incluindo uma área menor que 1/3 da área do núcleo principal.....	29
Figura 6 – Leitura da CIM das bactérias anaeróbias.....	33
Figura 7 – Valores médios ($\pm$ desvio padrão) de UFC/mL e percentual de redução de biofilmes de <i>Fusobacterium nucleatum</i> expostos ao extrato de barbatimão.....	35
Figura 8 – Valores médios ($\pm$ desvio padrão) de UFC/mL e percentual de redução de biofilmes de <i>Porphyromonas endodontalis</i> expostos ao extrato de barbatimão.....	36
Figura 9– Valores médios ($\pm$ desvio padrão) de UFC/mL e percentual de redução de biofilmes de <i>Porphyromonas gingivalis</i> expostos ao extrato	

de barbatimão.....	37
Figura 10 - Valores médios ($\pm$ desvio padrão) de UFC/mL e percentual de redução de biofilmes de <i>Parvimonas micra</i> expostos ao extrato de barbatimão.....	38
Figura 11- Valores médios ($\pm$ desvio padrão) da viabilidade celular de macrófagos murinos (RAW 264.7) expostos ao extrato de barbatimão.....	39
Figura 12 – Valores médios ($\pm$ desvio padrão) da viabilidade celular de fibroblastos murinos (L929) expostos ao extrato de barbatimão.....	39
Figura 13 – Valores médios ($\pm$ desvio padrão) da viabilidade celular de queratinócitos humanos (HACAT) expostos ao extrato de barbatimão.....	40
Figura 14 - Valores médios ($\pm$ desvio padrão) da frequência de micronúcleos em macrófagos murinos (RAW 264.7) expostos ao extrato de barbatimão.....	41
Figura 15 - Valores médios ($\pm$ desvio padrão) da frequência de micronúcleos em fibroblastos murinos (L929) expostos ao extrato de barbatimão.....	42
Figura 16 - Valores médios ($\pm$ desvio padrão) da frequência de micronúcleos em queratinócitos humanos (HACAT) expostos ao extrato de barbatimão.....	43
Figura 17 - Efeito do extrato de <i>Stryphnodendron barbatiman</i> (Vell.) Mart. sobre a produção de citocinas em RAW 264.7 desafiados e não desafiados com LPS.....	45

Sper FL. Atividade antimicrobiana, anti-inflamatória, citotoxicidade e genotoxicidade do extrato glicólico de *Stryphnodendron barbatiman* (Vell.) Mart. (barbatimão) [dissertação]. São José dos Campos (SP): Universidade Estadual Paulista (Unesp), Instituto de Ciência e Tecnologia; 2018.

RESUMO

Stryphnodendron barbatiman (Vell.) Mart (barbatimão) tem sido utilizado popularmente como anti-inflamatório e antimicrobiano. Este estudo se propôs a realizar a análise fitoquímica do extrato de *S. barbatiman* (Vell.) Mart. (barbatimão) e verificar *in vitro* algumas de suas atividades biológicas, como: antimicrobiana, sobre culturas planctônicas e biofilmes de *Fusobacterium nucleatum*, *Porphyromonas endodontalis*, *Porphyromonas gingivalis*, e *Parvimonas micra*; citotoxicidade e genotoxicidade em macrófagos murinos (RAW 264.7), fibroblastos murinos (L929) e queratinócitos humanos (HACAT); e ação anti-inflamatória sobre RAW 264.7 estimuladas por lipopolissacarídeo (LPS) de *Escherichia coli*. A atividade antimicrobiana sobre culturas planctônicas foi avaliada pelo método de microdiluição em caldo. Após, as concentrações efetivas foram avaliadas sobre biofilmes monomicrobianos. A análise de citotoxicidade foi verificada pelo teste de redução do brometo de 3(4,5-dimetiltiazol-2-yl)2,5-difeniltetrazólio (MTT) e a de genotoxicidade pelo teste de micronúcleos. A atividade anti-inflamatória foi analisada quantificando os níveis de citocinas pró-inflamatórias (TNF- α , IL-1 β , IL-6 e IL-17) e anti-inflamatória (IL-10), por *enzyme-linked immunosorbent assay* (ELISA). Os dados foram analisados por ANOVA e Teste de Tukey, ou Kruskal-Wallis e teste de Dunns, com nível de significância de 5% ($P \leq 0,05$). O extrato foi eficaz sobre os biofilmes, redução entre 54 e 100%. O extrato não foi citotóxico para RAW 264.7 e L929 no tempo de 24 h nem para HACAT por 5 min e em 24 h 50 e 100 mg/mL aumentaram a viabilidade celular. O extrato de *S. barbatiman* (Vell.) Mart. não foi genotóxico para RAW 264.7. O extrato associado ao LPS aumentou a produção de todas as citocinas estudadas, exceto do TNF- α . Concluiu-se que o extrato de barbatimão foi eficaz sobre biofilme mono espécie de bactérias anaeróbias em concentrações não citotóxicas para RAW 264.7, L929 e HACAT.

Palavras-chave: Bactérias anaeróbias. *Stryphnodendron barbatiman*. Citotoxicidade. Genotoxicidade. Anti-inflamatório.

Sper FL. Antimicrobial, anti-inflammatory, cytotoxicity and genotoxicity activity of the glycolic extract of Stryphnodendron barbatiman (Vell.) Mart. [dissertation]. São José dos Campos (SP): São Paulo State University (Unesp), Institute of Science and Technology; 2018.

ABSTRACT

Anti-inflammatory and antimicrobial are popular uses of Stryphnodendron adstringens (Mart.) Coville (barbatimão). This study proposed to perform the phytochemical analysis of *S. barbatiman* (Vell.) Mart. (barbatimão) extract and to verify in vitro some of its biological activities as antimicrobial on planktonic cultures and biofilms of Fusobacterium nucleatum, Porphyromonas endodontalis, Porphyromonas gingivalis, and Parvimonas micra; cytotoxicity and genotoxicity on human keratinocytes (HACAT), murine macrophages (RAW 264.7) and fibroblasts (L929), and anti-inflammatory action on RAW 264.7. The antimicrobial activity on planktonic cultures was evaluated by broth microdilution. Afterwards, the effective concentrations were evaluated on mono microbial biofilms. The cytotoxicity analysis was verified by the MTT test and the genotoxicity by the micronucleus test. Anti-inflammatory activity was evaluated in RAW 264.7 stimulated by lipopolysaccharide (LPS) of *Escherichia coli* and treated with the extract, quantifying the levels of pro-inflammatory cytokines (TNF- α , IL-1 β , IL-6 and IL-17) and anti-inflammatory (IL-10), by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). The data that presented normal distribution were analyzed by ANOVA and Tukey's test, and those that were not, were analyzed by Kruskal-Wallis and Dunns test, with a significance level of 5% ($p \leq 0.05$). Barbatimão extract was effective on biofilms, reduction between 54 and 100%. The extract was not cytotoxic to RAW 264.7 and L929 in the 24 hr time nor to HACAT for 5 min and in 24 h 50 and 100 mg / ml increased cell viability. The extract of *S. barbatiman* (Vell.) Mart. was not genotoxic for RAW 264.7. The LPS-associated extract increased the production of all cytokines studied except for TNF- α . In conclusion, barbatimão extract was effective on mono-species biofilm of anaerobic bacteria at non-cytotoxic concentrations for RAW 264.7, L929 and HACAT.

Keywords: Anaerobic bacteria. Stryphnodendron barbatiman. Cytotoxicity. Genotoxicity. Anti-inflammatory.

1 INTRODUÇÃO

A busca por novos fármacos antimicrobianos tem se tornado cada vez mais importante devido, principalmente, à resistência que os micro-organismos desenvolvem depois de um tempo sob a ação destes medicamentos. Para tanto, elementos da natureza, como as plantas medicinais, tem sido estudados, por apresentarem diversas biomoléculas ativas. A partir destes vegetais poderão ser produzidos medicamentos fitoterápicos, com reconhecida eficácia e ausência de riscos à saúde, comprovadas por estudos toxicológicos, levantamentos etnofarmacológicos e documentações científicas indexadas (Agência Nacional de Vigilância Sanitária – ANVISA, 2014). Além disso, algumas comunidades têm acesso mais fácil a plantas medicinais do que aos medicamentos e, portanto, utilizam esses vegetais para tratamento de várias doenças.

Uma dessas plantas medicinais é *Stryphnodendron barbatiman* (Vell.) Mart, popularmente conhecida como barbatimão. Um vegetal rico em taninos que pertence à família Fabaceae e tem sinonímias científicas como *Stryphnodendron adstringens* (Mart.) Coville e *Mimosa barbadetiman* Vell. Na natureza, apresenta-se como uma árvore decídua, de 4 a 5 m de altura, com tronco cascudo, tortuoso e de cor clara. Suas folhas são compostas e bipinadas, com folíolos arredondados e ovalados. Nativo do cerrado, *S. barbatiman* (Vell.) Mart ocorre no centro-oeste e partes do sudeste brasileiro, produz frutos carnosos, castanho-claros, em formato de vagens cilíndricas e com muitas sementes (Lorenzi, Matos, 2002; Maroni et al., 2006). *Stryphnodendron* spp. é quimicamente composto por taninos, flavonoides, proantocianidinas, alcaloides, mucilaginosas, matérias resinosas, corantes e saponinas (Simões et al., 1999).

Empiricamente, o barbatimão tem sido utilizado para tratamentos de feridas, frieiras, diabetes, problemas de próstata, inflamações, gastrite, doenças do fígado, dores, leucorreia, gonorreia, diarreia, sangramentos, bem como antisséptico e antimicrobiano (Costa et al., 2013; Santana et al., 2016). Além disso, estudos têm demonstrado suas propriedades anti-inflamatória, cicatrizante e ação contra úlceras, protozoários e micro-organismos, como bactérias e fungos (Lima, 1998; Pereira et al., 2011; Costa et al., 2013).

Muitas infecções atingem a cavidade bucal, como as doenças periodontais e endodônticas. As infecções periodontais são aquelas que atingem os tecidos que ligam os dentes aos ossos, geralmente, resultam da interação entre biofilme subgengival e hospedeiro. O desequilíbrio nessa interação gera uma resposta imune caracterizada clinicamente como por inflamação. O biofilme é uma estrutura tridimensional complexa na qual várias espécies de micro-organismos estão envolvidas por uma matriz extracelular que dificulta a ação do sistema imune do hospedeiro e de agentes antimicrobianos. As espécies que compõem o biofilme variam de acordo com a maturidade desta estrutura, bem como, de indivíduo para indivíduo. Entretanto, sabe-se que algumas espécies podem favorecer o aparecimento de doenças periodontais e suas formas mais agressivas (Inaba, Amano, 2010; Bostanci, Belibasakis, 2012; Jorge, 2012; Karched et al., 2015; Pathan et al., 2017). Essas doenças podem provocar ou serem causadas por infecções endodônticas, aquelas que atingem a polpa dos dentes (Jorge, 2012; Pérez-Chaparro et al., 2018).

Dentre as bactérias envolvidas em infecções bucais está o *Fusobacterium nucleatum*. Trata-se de uma espécie de bacilos com as extremidades afiladas, Gram-negativos, imóveis, não esporulados, anaeróbios obrigatórios. Apesar dessa espécie não ser um colonizador inicial do biofilme, é importante na sua maturação, uma vez que é considerada como um colonizador intermediário com a capacidade de coagregar com várias espécies de colonizadores tardios. Esta bactéria está correlacionada com casos de gengivite e periodontite crônica, sendo responsável pela indução de expressão de metaloproteínases de matriz e liberação de lipopolissacarídeos (LPS) que estimulam a produção de interleucina 1 alfa (IL-1 α) e do fator de necrose tumoral alfa (TNF- α) por macrófagos, podendo estar associada à reabsorção óssea decorrente de periodontite apical (Özok et al., 2007; Jorge, 2012; Okuda et al., 2012; Karched et al., 2015).

Outra bactéria que pode estar presente em infecções bucais é a *Porphyromonas endodontalis*. São bacilos curtos, Gram-negativos, anaeróbios obrigatórios, não esporulados e imóveis que produzem pigmentos pretos quando cultivados em ágar sangue. Esta espécie pode ser isolada de bolsas periodontais, lesões periapicais, infecções endodônticas e biofilme do dorso da língua de pacientes com periodontite crônica. *P. endodontalis* é capaz de causar infecções

purulentas devido à presença de alguns fatores de virulência, como: LPS, cápsula, proteína de membrana externa, proteinases e produtos metabólicos citotóxicos. Embora ainda não seja possível considerá-la um patógeno claramente associado a doenças periodontais e endodônticas, alguns estudos têm demonstrado que sua ocorrência é mais alta em indivíduos que apresentam essas infecções, sugerindo que, associada a outros fatores, a presença de um patógeno potencialmente virulento, como a *P. endodontalis*, em altas contagens pode aumentar a virulência de toda a comunidade e influenciar o aparecimento dos sintomas de infecções endodônticas (Jorge, 2012; Galimanas et al., 2014; Pérez-Chaparro et al., 2018; Rôças, Siqueira Junior, 2018).

Porphyromonas gingivalis é outra espécie bacteriana presente em infecções bucais e é considerada o principal agente etiológico das doenças periodontais. São bacilos curtos, Gram-negativos, anaeróbios, não esporulados e imóveis que produzem pigmentos pretos quando cultivados em ágar sangue. Seu hábitat principal é o biofilme subgengival, mas já foram isoladas de amostras do dorso da língua, tonsilas, além de saliva e outras infecções bucais e sistêmicas. Apresentam alguns fatores de virulência como LPS, fímbrias, lipoproteínas e proteinases que permitem que essa espécie invada os tecidos do hospedeiro (Tamai et al., 2011; Bostanci, Belibasakis, 2012; Jorge, 2012).

Parvimonas micra são bactérias proteolíticas frequentemente isoladas de periodontites apicais e raramente de infecções em outras partes do corpo. Anteriormente, essa espécie era denominada *Peptostreptococcus (micromonas) micros*. Trata-se de cocos Gram-positivos, imóveis, não formadores de esporos, anaeróbios obrigatórios encontrados no sulco gengival. (Özok et al., 2007; Jorge, 2012; Karched et al., 2015, Rôças, Siqueira Junior, 2018).

Existem alguns requisitos que as substâncias utilizadas como medicamento ou cosmético devem atender. Estes requisitos envolvem a eficácia da substância ativa e sua biocompatibilidade. Existem testes para demonstrar o quanto uma substância pode ser tolerável para um organismo, como testes *in vitro* em que são utilizadas culturas de células ou tecidos, preferencialmente de mamíferos. Testes de citotoxicidade permitem avaliar a resposta biológica de células a uma determinada substância, medicamento ou produto cosmético por meio de aspectos específicos relacionados ao metabolismo, morfologia, crescimento celular e viabilidade celular.

Além disto, testes de genotoxicidade podem demonstrar os efeitos destas substâncias sobre o DNA da célula, além de mutações gênicas e aberrações cromossômicas (Agência Nacional de Vigilância Sanitária - ANVISA, 2009).

Estudos têm verificado a ação de extratos de barbatimão sobre micro-organismos e sua biocompatibilidade. Foi demonstrado que taninos condensados de *S. barbatiman* (Vell.) Mart. influenciaram no crescimento e sobre fatores de virulência de *Candida albicans*, apresentando atividade antifúngica moderada em 103 isolados de líquido vaginal. Adicionalmente, foi verificado baixo efeito citotóxico para macrófagos murinos (J774G8) e células renais de macaco-verde africano (Vero) (Ishida et al., 2006).

Miranda et al. (2008) estudaram o efeito antimicrobiano da solução do extrato hidroalcoólico de *S. adstringens* (Mart.) Coville e da mamona (Endoquil) comparados à clorexidina 2% sobre *Prevotella nigrescens*, *P. gingivalis*, *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* e *Actinomyces naeslundii*. Os autores concluíram que os produtos vegetais apresentaram ação antimicrobiana, porém a Concentração Inibitória Mínima (CIM) da clorexidina foi significativamente inferior às CIM dos derivados vegetais.

O extrato hidroalcoólico de *S. barbatiman* (Vell.) Mart. tem sido eficaz para o controle de *Staphylococcus aureus*, uma vez que foi relatada sua ação antimicrobiana sobre infecções causadas por esta bactéria (Ferreira et al., 2010).

Pereira et al. (2011) avaliaram a atividade antimicrobiana de três diferentes extratos (etanol, n-hexano e n-butanol) de *S. adstringens* (Mart.) Coville sobre cepas de referência de *C. albicans*, *Streptococcus mutans*, *S. aureus* e *A. actinomycetemcomitans* e constataram que os extratos inibiram o crescimento destes micro-organismos, exceto o extrato n-butanol que não foi efetivo para *A. actinomycetemcomitans*.

Em relação à genotoxicidade, Costa et al. (2010) demonstraram que a fração rica em polímeros de proantocianidinas do extrato da casca do caule de *S. adstringens* (Mart.) Coville além de não apresentar genotoxicidade para eritrócitos de camundongos Swiss, foi capaz de proteger o material genético contra danos, como demonstrado nos grupos tratados com ciclofosfamida, um agente reconhecidamente genotóxico.

Em 2011, Bachrach et al., analisando a alicina, principal constituinte terapêutico do alho, sobre microrganismos associados à cárie dental e doença periodontal, verificaram ação antimicrobiana tanto em cultura planctônica como em biofilme sobre bactérias cariogênicas, entretanto, os periodontopatógenos anaeróbios como *P. gingivalis* apresentaram baixa sensibilidade ao fitocomposto. Araghizadeh et al. (2013) demonstraram que o extrato de chá-verde (*Camellia sinensis*) apresentou forte atividade antibacteriana sobre *S. mutans*, *A. actinomycetemcomitans*, *P. gingivalis* e *P. intermedia*. Praveen et al. (2014) demonstraram potente efeito antimicrobiano da bromelina, molécula ativa extraída do abacaxi, sobre *S. mutans* e *P. gingivalis*.

Em 2013, Oliveira et al. avaliaram a atividade antimicrobiana de extratos glicólicos de *Equisetum arvense* L., *Glycyrrhiza glabra* L., *Punica granatum* L. e *S. barbatiman* (Vell.) Mart. contra *S. aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *S. mutans*, *C. albicans*, *Candida tropicalis* e *Candida glabrata*. Os autores demonstraram que todos os extratos avaliados foram efetivos contra os microrganismos estudados. Neste mesmo estudo também foi avaliada a citotoxicidade dos extratos em cultura de macrófagos murinos (RAW 264.7) por análise do metabolismo enzimático (teste de MTT) e produção das citocinas TNF- α e IL-1 β . Os resultados demonstraram que o extrato de *E. arvense* L. foi citotóxico, com viabilidade celular abaixo de 70%, nas concentrações testadas e os extratos de *G. glabra* L. (100 mg/mL), *P. granatum* L. (50 mg/mL) e *S. barbatiman* (Vell.) Mart. (50 mg/mL, 25 mg/mL e 3,13 mg/mL) não foram citotóxicos em um tempo de exposição de 24 h. Quanto à produção de citocinas, os extratos de *P. granatum* L. e *S. barbatiman* (Vell.) Mart. aumentaram significativamente a produção de IL-1 β e todos reduziram a quantidade de TNF- α , porém o nível basal de TNF- α estava mais elevado que o da IL-1 β .

Karygianni et al. (2014) avaliaram o efeito antimicrobiano de extratos naturais do Mediterrâneo, como *Olea europaea*, resina da aroeira e *Inula viscosa* sobre *C. albicans* e bactérias anaeróbias. Os autores constataram que os extratos apresentaram ação bactericida sobre as espécies anaeróbias estritas de *P. gingivalis*, *P. intermedia*, *F. nucleatum* e *P. micra*, no entanto, foram menos efetivos para *C. albicans*.

As infecções são clinicamente caracterizadas por inflamação que é um processo complexo para neutralizar, inativar ou eliminar um agente agressor ao

organismo. Esse agressor pode ser físico, químico ou biológico (bactérias, vírus, fungos e outros parasitas). O processo inflamatório envolve alterações vasculares, células e várias substâncias, como quimiocinas, citocinas, aminas vasodilatadoras e outros mediadores que vão regulá-lo e estimular, quando necessário, o reparo tecidual no local da agressão. Os sintomas da inflamação abrangem: dor, febre sistêmica ou local, vermelhidão e inchaço que muitas vezes leva à perda temporária da função do tecido afetado. O processo inflamatório pode ser capaz de resolver o problema em alguns dias e retomar os parâmetros homeostáticos (inflamação aguda) ou pode evoluir para a forma crônica exigindo uma intervenção farmacológica a fim de minimizar danos teciduais adicionais (Headland, Norling, 2015). Existem vários fármacos anti-inflamatórios disponíveis, por outro lado algumas comunidades não têm acesso a eles.

Em 1998, Lima conduziram um estudo para avaliar *in vivo* a atividade anti-inflamatória da fração solúvel em acetona do extrato metanólico bruto da casca do caule de *S. adstringens* (Mart.) Coville. Os ensaios foram conduzidos em ratos Wistar sendo: (i) edema agudo da pata traseira induzido por carragenina ou por dextrano; (ii) pleurite induzida por carragenina; e (iii) artrite induzida por adjuvante completo de Freund. Em camundongos Swiss foi analisado o aumento da permeabilidade vascular induzida por ácido acético. Os resultados do estudo demonstraram que essa fração do extrato vegetal reduziu significativamente o edema da pata traseira induzido por carragenina e dextrano. Além disso, o volume e a migração leucocitária, no modelo de pleurite aguda induzida por carragenina, também foram reduzidos. O aumento da permeabilidade vascular induzido por ácido acético na cavidade peritoneal de camundongos foi reduzido pelo extrato de forma semelhante à redução proporcionada pelo ácido acetilsalicílico. A artrite induzida por adjuvante completo de Freund é um modelo de inflamação crônica que permite a avaliação dos efeitos sobre a fase aguda e sobre a fase crônica da inflamação, nesse estudo, o extrato foi tão efetivo nas duas fases quanto a fenilbutazona. Portanto, os autores concluíram que os resultados corroboram o uso tradicional do barbatimão como anti-inflamatório.

Foi demonstrado que o extrato etanólico da casca do caule de *S. adstringens* (Mart.) Coville não foi citotóxico para monócitos humanos de paciente com leucemia (THP-1) e inibiu a liberação de TNF- α de maneira dose-dependente.

Além disso, frações aquosas e orgânicas desse extrato apresentaram significativa atividade anti-inflamatória dose-dependente em um modelo de artrite aguda induzida por LPS (Henriques et al., 2016).

Como o extrato de *S. barbatiman* (Vell.) Mart. se mostra promissor no tratamento de infecções e processos inflamatórios, pesquisas científicas sobre sua utilização eficaz e segura em produtos de saúde e higiene, inclusive odontológicos como enxaguatórios, dentifrícios, irrigantes e medicações intracanaais entre outros são necessárias.

2 PROPOSIÇÃO

O presente estudo se propôs a realizar a análise fitoquímica do extrato de *S. barbatiman* (Vell.) Mart. (barbatimão) e investigar algumas atividades farmacológicas, como:

- a) Antimicrobiana sobre bactérias anaeróbias obrigatórias de interesse odontológico, como *F. nucleatum*, *P. endodontalis*, *P. gingivalis*, e *P. micra*, em culturas planctônicas e biofilmes;
- b) Citotóxica para macrófagos (RAW 264.7) e fibroblastos (L929) murinos e queratinócitos humanos (HACAT);
- c) Genotóxica para RAW 264.7, L929 e HACAT;
- d) Anti-inflamatória analisada em RAW 264.7 estimuladas por LPS de *E. coli*, com quantificação de citocinas (TNF- α , IL-1 β , IL-6, IL-10, IL-17).

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Extrato vegetal

O extrato glicólico de *S. barbatiman* (Vell.) Mart., elaborado a partir da casca do caule da planta, foi obtido na concentração de 200 mg/mL em propilenoglicol (Mapric, São Paulo, Brasil), com os devidos laudos e especificações (ANEXO A).

3.2 Análises fitoquímicas

As análises fitoquímicas foram realizadas no Laboratório de Produtos Naturais da Universidade Anhanguera (UNIAN-SP).

3.2.1 Teor de sólidos solúveis em etanol

Béqueres de 25 mL foram pesados, em seguida 5 mL do extrato foram adicionados e levados para estufa a 80° C. Após secos, os béqueres foram pesados novamente e a quantidade de sólidos solúveis no extrato foi calculada utilizando a seguinte fórmula:

$$\% \text{ sol. solúveis (m/v)} = \frac{(m-b) \times 100}{V_a}$$

$$\% \text{ sol. solúveis (m/m)} = \% \text{ sol. solúvel (m/v)} / \text{densidade}$$

onde: b = massa do béquer

m = massa final do extrato, após secagem

3.2.2 Determinação do teor de fenóis totais

Foi transferido 1 mL do extrato para um balão volumétrico de 100 mL. O extrato foi dissolvido com um pouco de etanol e o volume foi completado com água destilada sob agitação (solução estoque). Uma alíquota de 200 μ L foi transferida para um balão volumétrico contendo aproximadamente 5 mL de água destilada e 800 μ L do reagente Folin – Ciocalteau (Merck KGaA, Darmstadt, Alemanha) foram adicionados. No intervalo de 1 a 8 min foram acrescentados 1,2 mL da solução de tampão carbonato-tartarato de sódio a 20%. O volume foi completado com água e a solução foi colocada em banho-maria a 20°C por 2h. Em seguida, a solução foi homogeneizada, e a absorbância foi lida em espectrofotômetro (Cary-50 da Varian) a 760 nm. O valor de fenóis totais foi determinado pela equação da reta (Rio, 1996; Bankova, Marcucci, 2000).

3.2.3 Determinação do teor de flavonoides totais expressos em quercetina

Foram preparados 10 mL de solução estoque com 100 μ L do extrato em metanol. Uma alíquota de 200 μ L desta solução foi transferida para um balão volumétrico, já com aproximadamente 5 mL de metanol. Foram adicionados 200 μ L de cloreto de alumínio ($AlCl_3$) o volume foi completado com metanol. A solução foi agitada e colocada em banho-maria por 30 min a 20°C. Após este tempo, a absorbância foi lida a 425 nm. A concentração de flavonoides totais expressos em quercetina foi calculada usando a equação da reta.

3.2.4 Avaliação da atividade antioxidante

O reagente DPPH (radical difenilpicrilhidrazila, Sigma-Aldrich Co., Alemanha) foi diluído seriadamente no extrato a 0,01% V/V em etanol a cada 1 min. Os tubos

foram homogeneizados e a leitura da absorbância foi feita em 517 nm após 30 minutos da adição do DPPH no 1º. tubo. A concentração do extrato capaz de eliminar 50% dos radicais livres (CE_{50} [$\mu\text{g/mL}$]) foi calculada pelo método dos mínimos quadrados (Veiga et al., 2017).

3.3 Bactérias anaeróbias

O cultivo e testes com bactérias anaeróbias foram realizados no Laboratório de Estudos Interdisciplinares em Células (LEIC) do Instituto de Ciência e Tecnologia (ICT) da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” – UNESP em São José dos Campos – SP.

Cepas de referência (ATCC - *American Type Culture Collection*) de *F. nucleatum* (ATCC 25586), *P. endodontalis* (ATCC 35406), *P. gingivalis* (ATCC 33277), e *P. micra* (ATCC 23195), provenientes do Laboratório de Biotecnologia da Faculdade de Ciências Farmacêuticas (FCF), Unicamp, Campinas – SP, Brasil, foram utilizadas neste estudo. As bactérias foram congeladas a -80°C e reativadas em caldo Brucella (Acumedia, Michigan, USA) suplementado com 5% de sangue desfibrinado estéril de carneiro (Newprov, Pinhais – PR, Brasil), 1% de hemina (Sigma-Aldrich Co.) e 1% de menadiona (Sigma-Aldrich Co.).

3.4 Atividade antimicrobiana sobre culturas planctônicas

A CIM foi determinada pelo método de microdiluição em caldo segundo normas do *Clinical and Laboratory Standards Institute* - CLSI (2007), documento M11-A7.

As bactérias foram cultivadas em caldo Brucella suplementado a 37°C por 48 h em anaerobiose: nitrogênio 80%, dióxido de carbono 10% e hidrogênio 10%; (Whitley DG250 Workstation, West Yorkshire, Reino Unido). Em seguida, suspensões microbianas foram preparadas em solução salina estéril (NaCl 0,9%) e

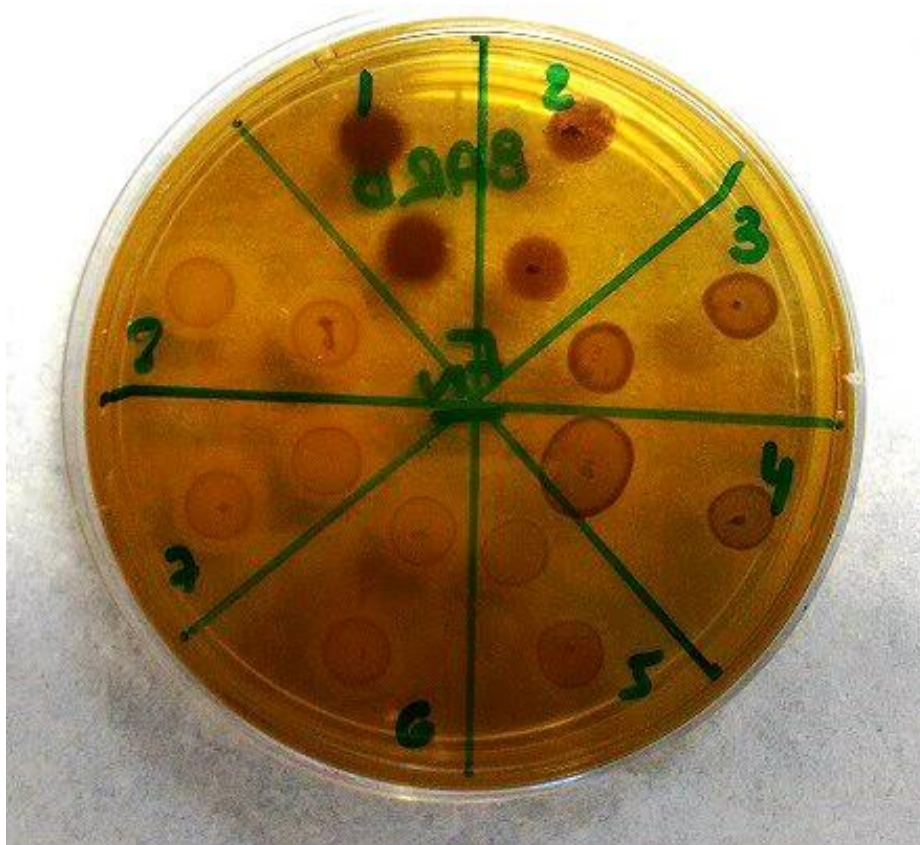
padronizadas com turbidez 0,5 da escala de McFarland, aproximadamente $1,5 \times 10^8$ unidades formadoras de colônia por mililitro (UFC/mL). Em placa de microtitulação (Kasvi, Curitiba, PR, Brasil), foram adicionados 100 µL de meio de cultura em cada poço e 100 µL do extrato, apenas no primeiro poço, de onde partiu uma série de oito diluições seriadas com concentrações de 100 a 0,78 mg/mL em duplicata, conforme a Figura 1. Foram adicionados 10 µL do inóculo padronizado em todos os poços. As microplacas foram incubadas em anaerobiose por 48 h. Em seguida, a olho nu, foi verificada a menor concentração do extrato capaz de inibir o crescimento bacteriano, por meio de análise de ausência de turvação do meio. Em seguida, o conteúdo do poço foi homogeneizado e foram adicionados 20 µL de cada concentração em ágar Brucella (Acumedia) suplementado com 1% de hemina e 1% de menadiona. Após 48 h de incubação em anaerobiose (Figura 2), as concentrações que não apresentaram crescimento microbiano foram consideradas bactericidas e a menor foi dada como concentração bactericida mínima (CBM).

Figura 1 – Microdiluição do extrato glicólico de *S. barbatiman* (Vell.) Mart. em caldo Brucella suplementado com 1% de hemina, 1 % de menadiona e 5% de sangue desfibrinado estéril de carneiro



Fonte: Elaborada pela autora.

Figura 2– Placa de ágar Brucella com 20 µL de cada concentração para definição da Concentração Bactericida Mínima (CBM)



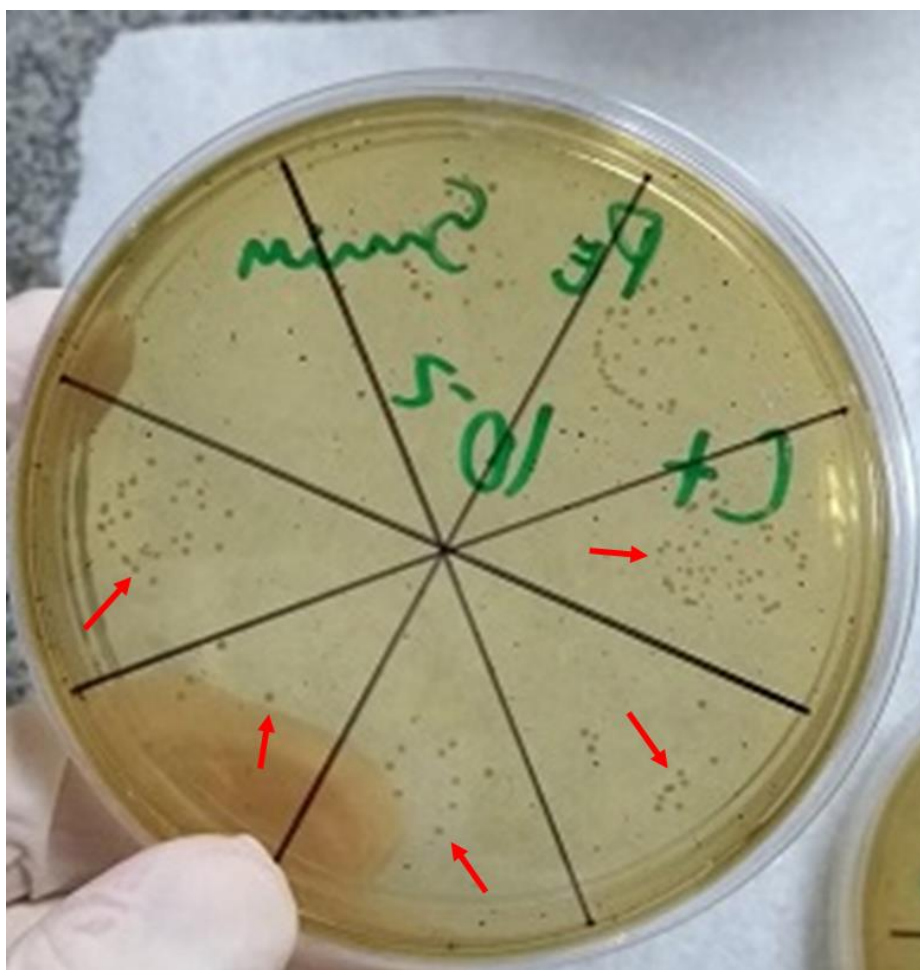
Fonte: Elaborada pela autora.

3.5 Atividade antimicrobiana sobre biofilmes

As bactérias foram adicionadas separadamente em placas de microtitulação, sendo acrescentados 100 µL/poço de suspensão microbiana padronizada ($1,5 \times 10^8$ UFC/mL) em 100 µL/poço de caldo Brucella suplementado. Os biofilmes foram formados por sete dias em anaerobiose a 37°C, no entanto, a cada 48 h o meio de cultura foi substituído. Os biofilmes foram expostos ao extrato vegetal, por 5 min ou 24 h, nas concentrações efetivas pré-determinadas sobre culturas planctônicas (CIM, CBM ou superiores). Como controles foram utilizadas solução de clorexidina 0,12% e solução salina estéril (NaCl 0,9%), para o tempo de 5 min, e caldo Brucella

suplementado, para o tempo de 24 h. Após exposição, estas soluções foram descartadas, o biofilme foi lavado com solução salina estéril, e desagregado com homogeneizador ultrassônico (Sonoplus HD 2200 – Bandelin Electronic GmbH & Co. KG, Berlim, Alemanha), com potência de 25% por 30 s. Em seguida, a suspensão dos grupos tratados foi diluída seriadamente a 10^{-2} e 10^{-4} , e a suspensão do grupo controle foi diluída, além dessas, a 10^{-6} também. Em seguida, 20 μ L de cada diluição foram semeados em ágar Brucella suplementado. Após incubação em anaerobiose (37°C/48 h), as colônias foram contadas e dada sua concentração em UFC/mL, em cada grupo experimental (Figura 3).

Figura 3 – Placa de ágar Brucella para contagem de colônias e determinação de concentração em UFC/mL



Fonte: Elaborada pela autora.

3.6 Cultivo das células

O cultivo e testes com células de mamíferos foram realizados no LEIC, ICT – UNESP em São José dos Campos – SP.

Macrófagos murinos (RAW 264.7), fibroblastos murinos (L929) e queratinócitos humanos (HACAT) provenientes do Banco de Células do Rio de Janeiro - Associação Técnico Científica Paul Ehrlich (APABCAM, Rio de Janeiro, Brasil) foram cultivados em meio de Eagle modificado por Dulbecco (DMEM - LGC Biotecnologia, Cotia, Brasil), suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB – Invitrogen, Nova York, Estados Unidos da América) e 1% de penicilina-estreptomicina (Gibco, Grand Island, Nova York, Estados Unidos da América) e mantidos em frascos de cultivo celular (TPP, Suíça), à 37°C, com 5% de CO₂ e umidade atmosférica.

O meio de cultura foi trocado a cada 48 h e quando foi observado estado de subconfluência das células, caracterizado pela ocupação de mais de 70% do assoalho do frasco, as células foram utilizadas nos testes. Para tanto, a monocamada celular foi desagregada do frasco de cultura com auxílio de um varredor celular e a suspensão de células foi centrifugada por 5 min a 2000 rpm (Hermle Z-300 K – Labnet, Edison, EUA). Teste de exclusão com azul de Trypan (0,4%, Sigma-Aldrich), foi realizado para checar a integridade das células e contagem de células viáveis.

3.7 Análise de citotoxicidade por teste de MTT

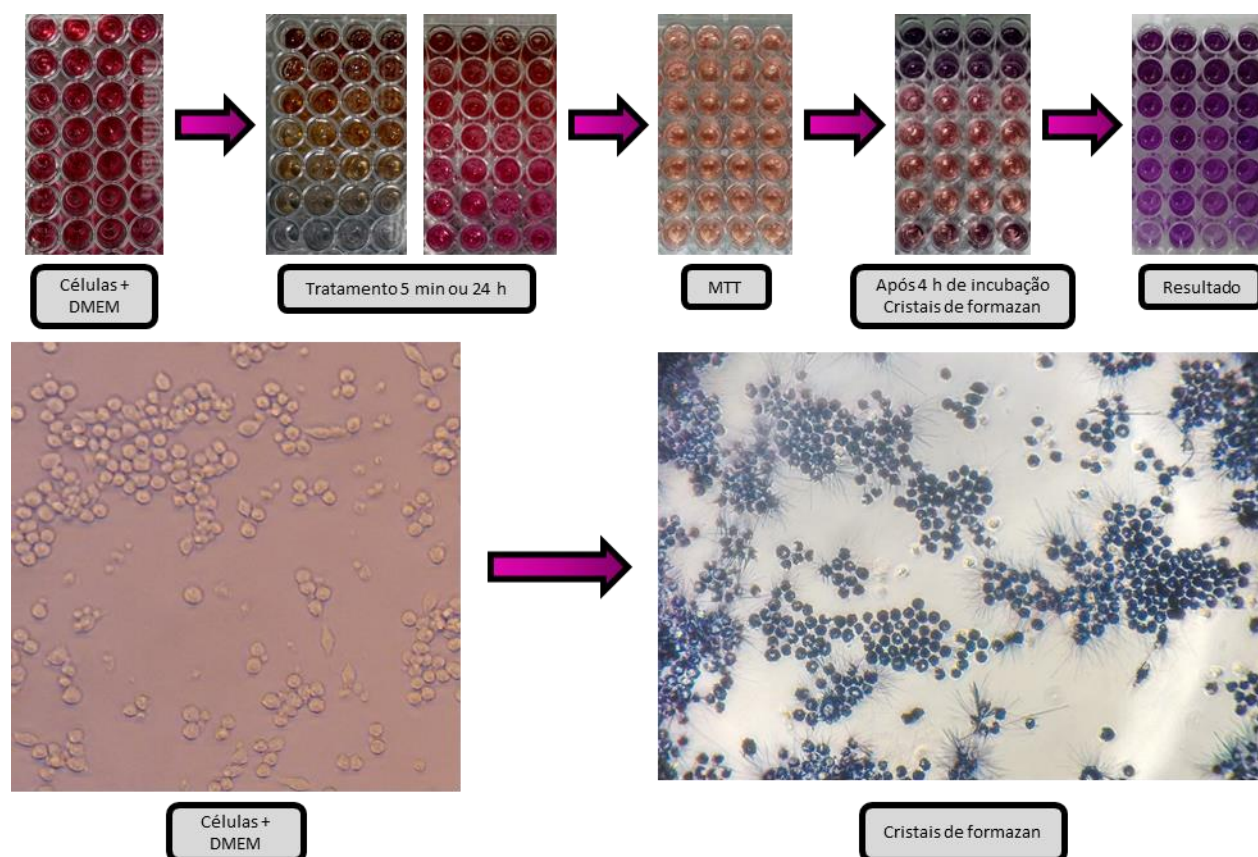
Em microplacas de 96 poços foram adicionados 200 µL de DMEM contendo 4×10^4 células viáveis. Estas placas foram incubadas (37°C e 5% de CO₂) por 24 h para aderência celular aos poços. Em seguida, o sobrenadante foi descartado, as células foram lavadas com tampão fosfato-salino (PBS - LGS Biotecnology, Cotia, Brasil), e foram acrescentados 200 µL/poço de extrato nas concentrações de 200 mg/mL a 6,25 mg/mL para o tempo de exposição de 5 min e nas concentrações de

100 mg/mL a 3,13 mg/mL para o tempo de 24 h (n = 12/grupo). Meio de cultura sem extrato foi utilizado como controle. Após o tempo de exposição, o sobrenadante foi descartado, e os poços foram lavados com PBS para retirar células afetadas.

Para verificação da viabilidade da cultura, foi realizada análise da atividade enzimática das células viáveis pelo método de redução do brometo de 3(4,5-dimetiltiazol-2-yl)2,5-difeniltetrazólio (MTT) em formazan. A solução de MTT foi preparada a partir da suspensão de 0,5 mg do pó de MTT (Sigma-Aldrich) em 1 mL de meio DMEM. Foram adicionados 100 µL/poço da solução de MTT e as placas foram incubadas (37°C e 5% de CO₂) por 4 h, abrigadas da luz. Posteriormente, esta solução foi descartada e foram adicionados 100 µL/poço de dimetilsulfóxido (DMSO – Sigma-Aldrich) para expor os cristais de formazan produzidos, após absorção do sal de MTT por células viáveis (Figura 4). Após incubação de 10 min e agitação em mesa orbital, por igual período, a absorbância dos poços foi lida em leitora de microplacas a 570 nm. As densidades ópticas (DO) obtidas foram convertidas em percentual de viabilidade celular empregando-se a seguinte fórmula:

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

Figura 4 – Esquema do teste de MTT



Legenda: Tratamento de 5 min = diluição do extrato em solução salina estéril (NaCl 0,9%), Tratamento de 24 h = diluição do extrato em meio DMEM.

Fonte: Elaborada pela autora.

3.8 Análise de genotoxicidade por teste de micronúcleos (MN)

O teste de MN foi realizado de acordo com *OECD Guidelines for Testing of Chemicals, Section 4: Health Effects, Test N° 487: In Vitro Mammalian Cell Micronucleus Test*, atualizado em 2014, da *Organisation for Economic Co-operation and Development - OECD*.

Macrófagos, fibroblastos e queratinócitos foram cultivados, separadamente, em DMEM a 37°C e 5% CO₂. Para o teste, 5 x 10⁵ células viáveis/poço foram cultivadas em placas de 24 poços por 24 h a 37°C e 5% CO₂. Em seguida, as células foram expostas por 24 h a diferentes concentrações do extrato vegetal

diluído em DMEM, ao etilmetano sulfonato (EMS) 5 μM , que foi utilizado como controle positivo, e ao DMEM puro que foi utilizado como controle negativo.

Após 24 h, os sobrenadantes foram descartados, as células foram lavadas duas vezes com PBS e incubadas com 300 μL /poço citocalasina B (Sigma-Aldrich) na concentração de 6 $\mu\text{g/mL}$ por 24 h a 37°C e 5% CO_2 , para inibir a citocinese e induzir o acúmulo de células binucleadas. Em seguida, a citocalasina B foi descartada e as células foram lavadas duas vezes com PBS e fixadas com 300 μL /poço de metanol por 10 min. O metanol foi descartado e as células foram lavadas duas vezes com PBS e coradas com 300 μL /poço de DAPI a 300 nM diluído em PBS por 10 min. As células foram lavadas 2 vezes com PBS e observadas em microscópio de fluorescência, sendo que foram avaliadas 2.000 células/poço por concentração ($n = 3$). Os MN foram identificados como estruturas de DNA contidas no citoplasma claramente separados do núcleo principal, cercados por uma membrana nuclear e incluindo uma área menor que 1/3 da área do núcleo principal (Figura 5). Foram contadas as células com menos de cinco MN.

Figura 5 – Detalhe de um Micronúcleo - estrutura de DNA contida no citoplasma claramente separado do núcleo principal, cercado por uma membrana nuclear e incluindo uma área menor que 1/3 da área do núcleo principal



Fonte: Elaborada pela autora.

3.9 Avaliação da atividade anti-inflamatória

Em placas de 24 poços, células RAW 264.7 foram cultivadas na concentração de 5×10^5 células/mL por 24 h. Após incubação, o sobrenadante foi descartado e foi acrescentado meio de cultura acrescido de diferentes concentrações do extrato de barbatimão. Ao mesmo tempo, foi acrescentado LPS de *E. coli* (Sigma) na concentração de 1 µg/mL, em cada poço. As placas foram incubadas por 24 h (37°C e 5% de CO₂). Grupos sem LPS foram utilizados como controles.

Posteriormente, os sobrenadantes foram coletados e armazenados a -20°C para posterior quantificação de citocinas pró-inflamatórias (TNF-α, IL-1β, IL-6 e IL-17) e anti-inflamatória (IL-10), por ELISA.

Microplacas (Greiner-BioOne, Bélgica) foram sensibilizadas com anticorpos de captura anti-TNF-α, anti-IL-1β, anti-IL-6, anti-IL-17 ou anti IL-10 de camundongo (R&D Systems, Mineápolis, Estados Unidos da América) e mantidas *overnight* em temperatura ambiente. No dia seguinte, as placas foram lavadas com PBS contendo Tween 20 (PBS-T) e bloqueadas com soro albumina bovina (BSA, 0,1%) por 1 h. Após, as placas foram lavadas com PBS-T e receberam os sobrenadantes das culturas de células (100 µL/poço) e os padrões das citocinas com concentrações conhecidas (curva-padrão). Os testes foram realizados em duplicata. Após 2 h, as placas foram lavadas (PBS-T) e foram acrescentados anticorpos de detecção anti-TNF-α, anti-IL-1β, anti-IL-6, anti-IL-17 ou anti IL-10 marcados com biotina. Após 2 h, a reação foi revelada com solução contendo substrato cromogênico e peróxido de hidrogênio. A reação foi bloqueada após 20 min com ácido sulfúrico 2N. As DO foram lidas em espectrofotômetro de microplacas (Biotek) a 450 nm. Após obtenção das DO foram determinados os níveis das citocinas (pg/mL) com auxílio do programa GraphPad Prism 5.0.

3.10 Análise estatística

Os resultados foram apresentados em valores médios ($\pm$ desvio-padrão). Os dados que apresentaram distribuição normal foram analisados estatisticamente por ANOVA de um fator complementado por Teste de Tukey, com nível de significância de 5% ($P \leq 0,05$). Os resultados que não apresentaram distribuição normal foram analisados por teste de Kruskal-Wallis e teste de Dunns, com nível de significância de 5% ($P \leq 0,05$).

4 RESULTADOS

4.1 Análise fitoquímica

4.1.1 Teores de sólidos solúveis em etanol, fenóis e flavonoides totais

O extrato de *S. barbatiman* (Vell.) Mart. apresentou, em média, 7,07% de sólidos solúveis em etanol. Os teores de fenóis totais (expressos em fenol) e flavonoides totais (expressos em quercetina) do extrato de *S. barbatiman* (Vell.) Mart. foram, respectivamente, 2,70 e 19,37 µg/mL do extrato, conforme Tabela 1.

Tabela 1 – Teores de sólidos solúveis em etanol, fenóis e flavonoides totais do extrato de *Stryphnodendron barbatiman* (Vell.) Mart.

	Média*	DP**
Sólidos solúveis em etanol	7,07	0,18
Fenóis totais	2,70	0,20
Flavonoides totais	19,37	0,81

Legenda: * % para sólidos solúveis em etanol e µg/mL do extrato para fenóis e flavonoides totais.

**DP é o desvio padrão. n = 2 para sólidos solúveis em etanol e n = 9 para fenóis e flavonoides totais.

Fonte: Laboratório de Produtos Naturais, UNIAN-SP.

4.1.2 Atividade antioxidante

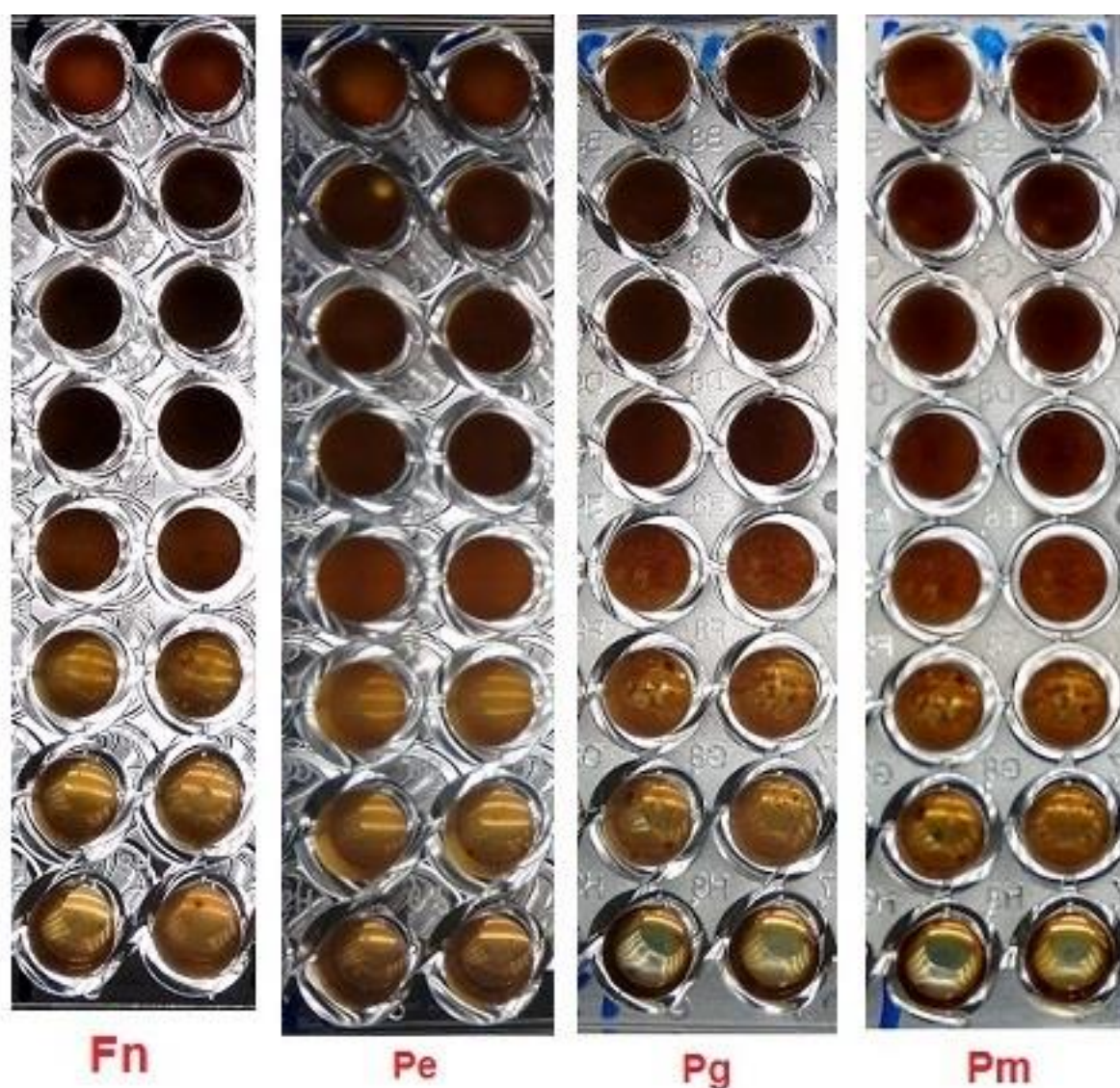
A atividade antioxidante do extrato de *S. barbatiman* (Vell.) Mart. representada pela concentração do extrato capaz de eliminar 50% dos radicais livres presentes no tubo (CE₅₀) foi 32,07 µg/mL.

4.2 Atividade antimicrobiana sobre culturas planctônicas

4.2.1 Concentração Inibitória Mínima (CIM)

Não foi possível determinar as CIM dos micro-organismos testados devido à turbidez do extrato de barbatimão e coloração do meio, conforme Figura 6.

Figura 6 – Leitura da CIM das bactérias anaeróbias



Legenda: Fn = *F. nucleatum*, Pe = *P. endodontalis*, Pg = *P. gingivalis*, e Pm = *P. micra*.

Fonte: Elaborada pela autora.

4.2.2 Concentração Bactericida Mínima (CBM)

O extrato de barbatimão foi efetivo sobre *F. nucleatum*, apresentando CBM de 50 mg/mL. Por outro lado, sobre as demais bactérias *P. endodontalis*, *P. gingivalis* e *P. micra*, CBM maior que 100 mg/mL foi determinada (Quadro 1).

Quadro 1 – Concentrações Bactericidas Mínimas do extrato glicólico de *Stryphnodendron barbatiman* (Vell.) Mart. sobre micro-organismos anaeróbios

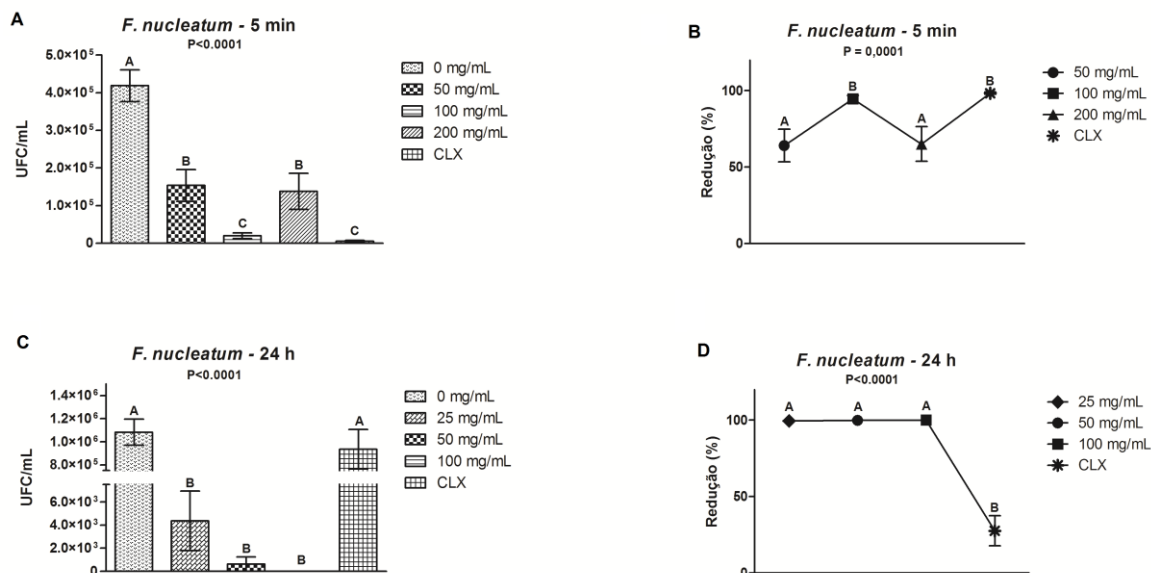
Bactérias	CBM
<i>F. nucleatum</i>	50 mg/mL
<i>P. endodontalis</i>	> 100 mg/mL
<i>P. gingivalis</i>	> 100 mg/mL
<i>P. micra</i>	> 100 mg/mL

Fonte: Elaborado pela autora.

4.3 Atividade antimicrobiana do extrato sobre biofilmes

O extrato de barbatimão reduziu significativamente o biofilme de *F. nucleatum* no tempo de 5 min, enquanto o controle apresentou $4,19 \times 10^5$ UFC/mL os grupos tratados com extrato e com clorexidina 0,12% ficaram abaixo de $1,54 \times 10^5$ UFC/mL. Em percentual a redução foi de 64, 95, 65 e 98 para as concentrações de 50, 100, 200 mg/mL e clorexidina, respectivamente. A concentração de 100 mg/mL foi a mais eficaz e foi estatisticamente semelhante à clorexidina. Em 24 h a redução proporcionada pelo extrato ficou entre 99 e 100%, maior do que a proporcionada pela clorexidina (28%). O controle teve um crescimento de $1,08 \times 10^6$ UFC/mL e a clorexidina apresentou cerca de $934,4 \times 10^3$ enquanto os grupos tratados com o extrato apresentaram de 0 a $4,4 \times 10^3$ UFC/mL. (Figura 7).

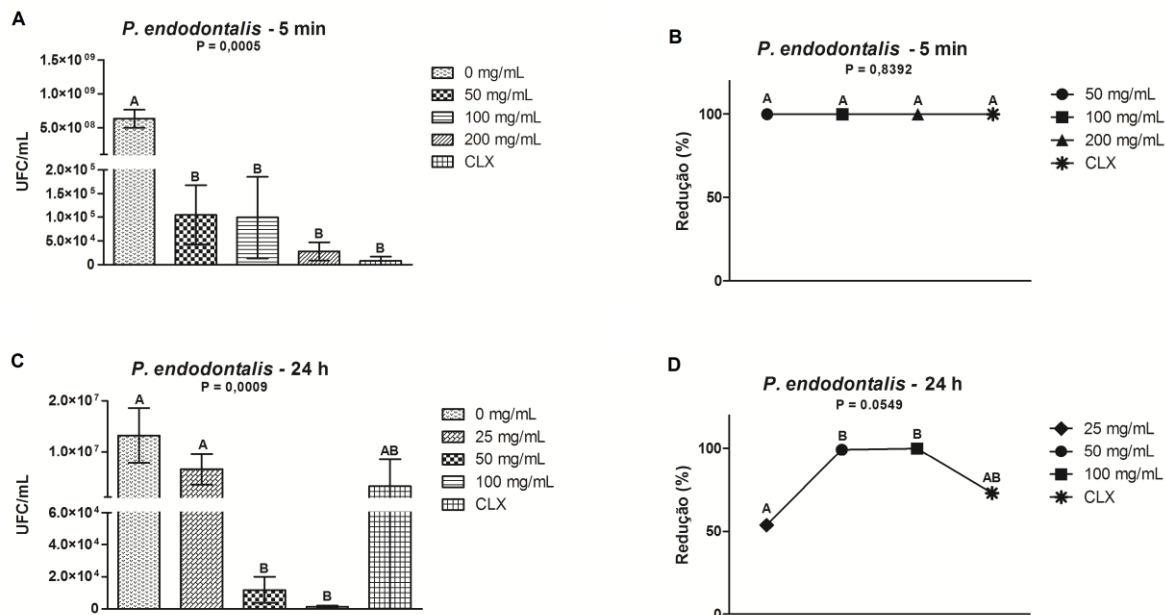
Figura 7 – Valores médios ($\pm$ desvio padrão) de UFC/mL e percentual de redução de biofilmes de *Fusobacterium nucleatum* expostos ao extrato de barbatimão



Legenda: CLX = clorexidina 0,12%. Letras diferentes indicam grupos estatisticamente diferentes. A – UFC /mL de *F. nucleatum* exposto ao extrato por 5 min (n = 8. ANOVA, teste de Tukey, $P \leq 0,05$); B – percentual de redução do biofilme de *F. nucleatum* exposto ao extrato por 5 min; C – UFC/mL de *F. nucleatum* exposto ao extrato por 24 h; D – percentual de redução do biofilme de *F. nucleatum* exposto ao extrato por 24 h. (n = 8. Kruskal-Wallis, teste de Dunns, $P \leq 0,05$).
Fonte: Elaborada pela autora.

O controle do biofilme de *P. endodontalis* apresentou crescimento de $6,3 \times 10^8$ UFC/mL enquanto os grupos tratados apresentaram crescimentos de $1,05 \times 10^5$ (50mg/mL); $0,99 \times 10^5$ (100 mg/mL); $0,28 \times 10^5$ (200 mg/mL) e $0,08 \times 10^5$ (clorexidina 0,12%). Assim, tanto o extrato de *S. barbatiman* (Vell.) Mart quanto a clorexidina foram capazes de reduzir cerca de 100% do biofilme no tempo de exposição de 5 min. Já em 24 h, a concentração de 25 mg/mL foi capaz de reduzir 54% do biofilme ($6,5 \times 10^6$ UFC/mL), 50 e 100 mg/mL reduziram mais de 99% do biofilme ($11,87 \times 10^3$ e $1,25 \times 10^3$ UFC/mL, respectivamente) e a clorexidina reduziu 73% do biofilme ($3,19 \times 10^6$ UFC/mL). Estatisticamente, as reduções proporcionadas pelo extrato a 50 e 100 mg/mL e pela clorexidina foram significativas quando comparadas ao controle (Figura 8).

Figura 8 – Valores médios ($\pm$ desvio padrão) de UFC/mL e percentual de redução de biofilmes de *Porphyromonas endodontalis* expostos ao extrato de barbatimão

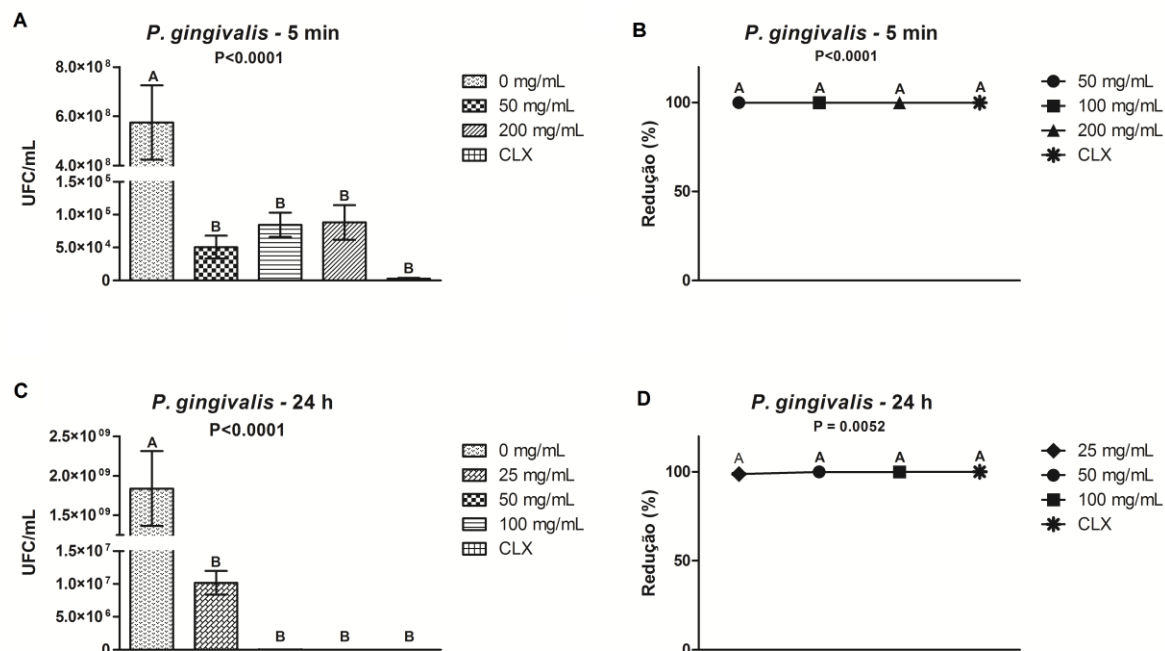


Legenda: CLX = clorexidina 0,12%. Letras diferentes indicam grupos estatisticamente diferentes. A – UFC /mL de *P. endodontalis* exposto ao extrato por 5 min; B – percentual de redução do biofilme de *P. endodontalis* exposto ao extrato por 5 min; C – UFC/mL de *P. endodontalis* exposto ao extrato por 24 h; D – percentual de redução do biofilme de *P. endodontalis* exposto ao extrato por 24 h. (n = 8. Kruskal-Wallis, teste de Dunns, $P \leq 0,05$).

Fonte: Elaborada pela autora.

Na Figura 9, pode-se observar que o extrato de barbatimão foi significativamente eficaz sobre o biofilme de *P. gingivalis* nos dois tempos testados. Em 5 min, o barbatimão proporcionou redução de 100% do biofilme nas concentrações de 50 mg/mL ($5,0 \times 10^4$ UFC/mL), 100 mg/mL ($8,4 \times 10^4$ UFC/mL) e 200 mg/mL ($8,8 \times 10^4$ UFC/mL) assim como a clorexidina ($0,25 \times 10^4$ UFC/mL). Em 24 h, as concentrações de 25 mg/mL ($1,02 \times 10^7$ UFC/mL), 50 mg/mL ($0,3 \times 10^5$ UFC/mL) e 100 mg/mL ($0,02 \times 10^5$ UFC/mL) também foram estatisticamente semelhantes à clorexidina (0 UFC/mL) e reduziram 100% desse biofilme.

Figura 9– Valores médios ($\pm$ desvio padrão) de UFC/mL e percentual de redução de biofilmes de *Porphyromonas gingivalis* expostos ao extrato de barbatimão

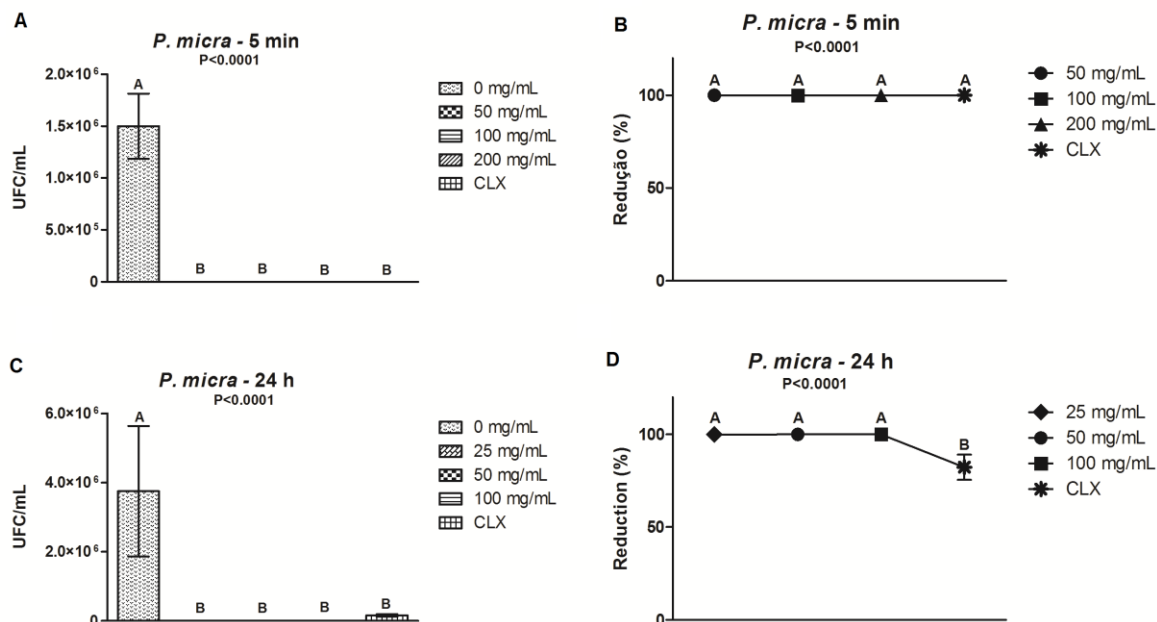


Legenda: CLX = clorexidina 0,12%. Letras diferentes indicam grupos estatisticamente diferentes. A – UFC /mL de *P. gingivalis* exposto ao extrato por 5 min (n = 8. ANOVA, teste de Tukey, $P \leq 0,05$); B – percentual de redução do biofilme de *P. gingivalis* exposto ao extrato por 5 min; C – UFC/mL de *P. gingivalis* exposto ao extrato por 24 h; D – percentual de redução do biofilme de *P. gingivalis* exposto ao extrato por 24 h. (n = 8. Kruskal-Wallis, teste de Dunns, $P \leq 0,05$).

Fonte: Elaborada pela autora.

O extrato de *Stryphnodendron barbatiman* (Vell.) Mart causou total redução de *P. micra* em todas as concentrações testadas tanto em 5 min quanto em 24 h. Já a clorexidina promoveu redução total do biofilme em 5 min, mas em 24 h apresentou crescimento de $1,56 \times 10^5$ UFC/mL enquanto o controle teve crescimento de $3,75 \times 10^6$ UFC/mL. Em percentual a redução promovida pela clorexidina representou 83%. A ação da clorexidina foi estatisticamente semelhante à do extrato quando comparados em relação ao crescimento, porém em percentual, o extrato foi mais eficaz do que a clorexidina (Figura 10).

Figura 10 - Valores médios ($\pm$ desvio padrão) de UFC/mL e percentual de redução de biofilmes de *Parvimonas micra* expostos ao extrato de barbatimão



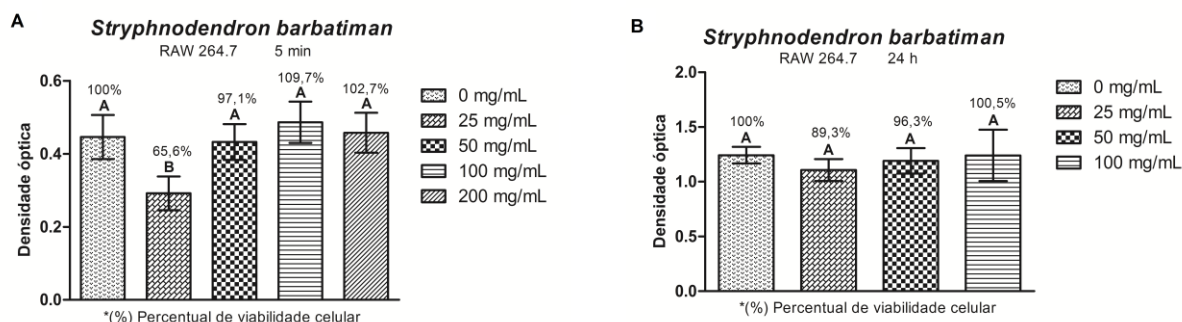
Legenda: CLX = clorexidina 0,12%. Letras diferentes indicam grupos estatisticamente diferentes. A – UFC /mL de *P. micra* exposto ao extrato por 5 min; B – percentual de redução do biofilme de *P. micra* exposto ao extrato por 5 min; C – UFC/mL de *P. micra* exposto ao extrato por 24 h; D – percentual de redução do biofilme de *P. micra* exposto ao extrato por 24 h. (n = 8. Kruskal-Wallis, teste de Dunns, P ≤ 0,05).

Fonte: Elaborada pela autora.

4.4 Citotoxicidade do extrato

O extrato de *S. barbatiman* (Vell.) Mart não afetou a viabilidade celular em relação ao controle de macrófagos RAW 264.7 nas concentrações de 200; 100 e 50 mg/mL; porém na concentração de 25 mg/mL houve redução significativa da viabilidade celular de RAW 264.7 expostos ao extrato por 5min. Já quando expostos ao extrato vegetal por 24 h, nenhuma das concentrações analisadas (100, 50 e 25 mg/mL) afetou a viabilidade celular em comparação ao controle (Figura 11).

Figura 11- Valores médios ($\pm$ desvio padrão) da viabilidade celular de macrófagos murinos (RAW 264.7) expostos ao extrato de barbatimão

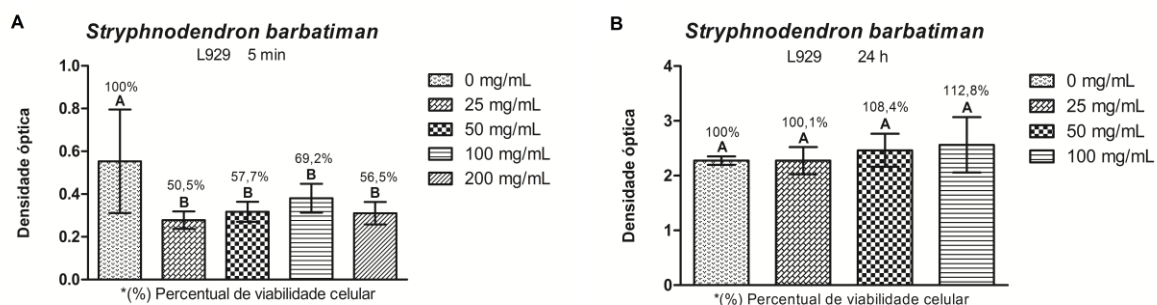


Legenda: Letras diferentes indicam grupos estatisticamente diferentes. A – viabilidade celular de RAW 264.7 expostos ao extrato por 5 min, B – viabilidade celular de RAW 264.7 expostos ao extrato por 24 h. (n = 8. ANOVA, teste de Tukey, $P \leq 0,05$).

Fonte: Elaborada pela autora.

O extrato vegetal diminuiu significativamente a viabilidade dos fibroblastos murinos (L929), em todas as concentrações avaliadas após exposição de 5 min, porém, no tempo de 24 h as concentrações de 100, 50 e 25 mg/mL não proporcionaram queda significativa da viabilidade (112,8; 108,4 e 100,1%, respectivamente), sendo semelhantes ao grupo controle (100% viáveis), conforme a Figura 12.

Figura 12 – Valores médios ($\pm$ desvio padrão) da viabilidade celular de fibroblastos murinos (L929) expostos ao extrato de barbatimão

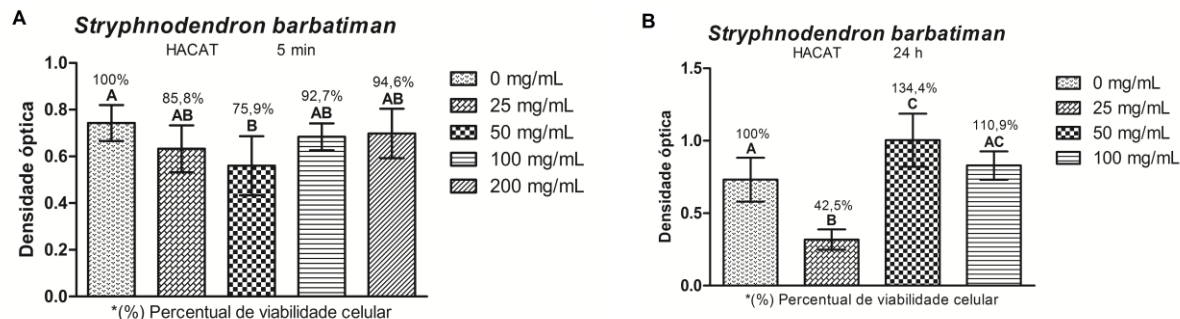


Legenda: Letras diferentes indicam grupos estatisticamente diferentes. A – viabilidade celular de L929 expostos ao extrato por 5 min, B – viabilidade celular de L929 expostos ao extrato por 24 h. (n = 8. ANOVA, teste de Tukey, $P \leq 0,05$).

Fonte: Elaborada pela autora.

As concentrações de 25, 100 e 200 mg/mL do extrato de *S. barbatiman* (Vell.) Mart, em 5 min, não apresentaram redução da viabilidade celular estatisticamente significativa sobre queratinócitos humanos (HACAT), enquanto a concentração de 50 mg/mL proporcionou uma redução significativa desta linhagem, porém acima de 70% de células viáveis. No tempo de exposição de 24 h, a concentração de 50 mg/mL aumentou significativamente a viabilidade celular (134,4%), a concentração de 100 mg/mL também aumentou a viabilidade dos queratinócitos, mas estatisticamente foi semelhante tanto ao aumento proporcionado por 50 mg/mL quanto ao grupo controle. O extrato de barbatimão na concentração de 25 mg/mL reduziu significativamente a viabilidade celular de HACAT (42,5%) no tempo de 24 h (Figura 13).

Figura 13 – Valores médios ($\pm$ desvio padrão) da viabilidade celular de queratinócitos humanos (HACAT) expostos ao extrato de barbatimão



Legenda: Letras diferentes indicam grupos estatisticamente diferentes. A – viabilidade celular de HACAT expostos ao extrato por 5 min, B – viabilidade celular de HACAT expostos ao extrato por 24 h. (n = 8. ANOVA, teste de Tukey, $P \leq 0,05$).

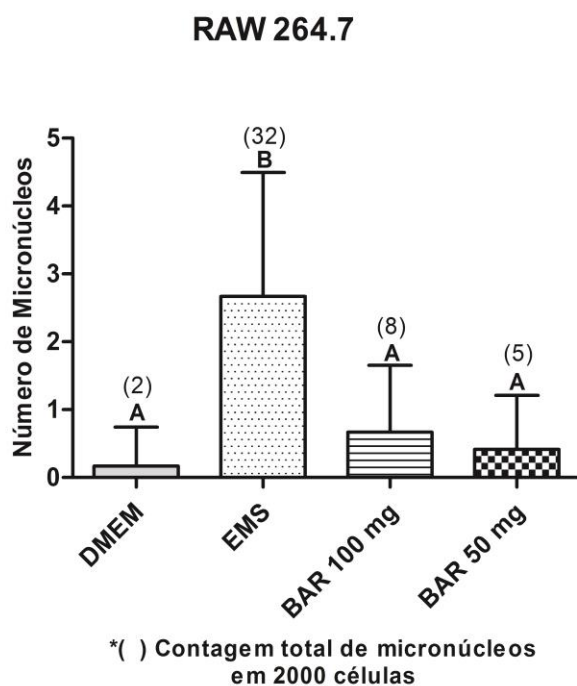
Fonte: Elaborada pela autora.

4.5 Genotoxicidade do extrato

Em macrófagos murinos da linhagem RAW 264.7 foram contados 5 MN no grupo tratado com o extrato de barbatimão na concentração de 50 mg/mL e 8 MN no grupo tratado com 100 mg/mL. Esses resultados foram estatisticamente

semelhantes ao grupo tratado somente com meio DMEM (2 MN), conforme Figura 14.

Figura 14 - Valores médios ($\pm$ desvio padrão) da frequência de micronúcleos em macrófagos murinos (RAW 264.7) expostos ao extrato de barbatimão

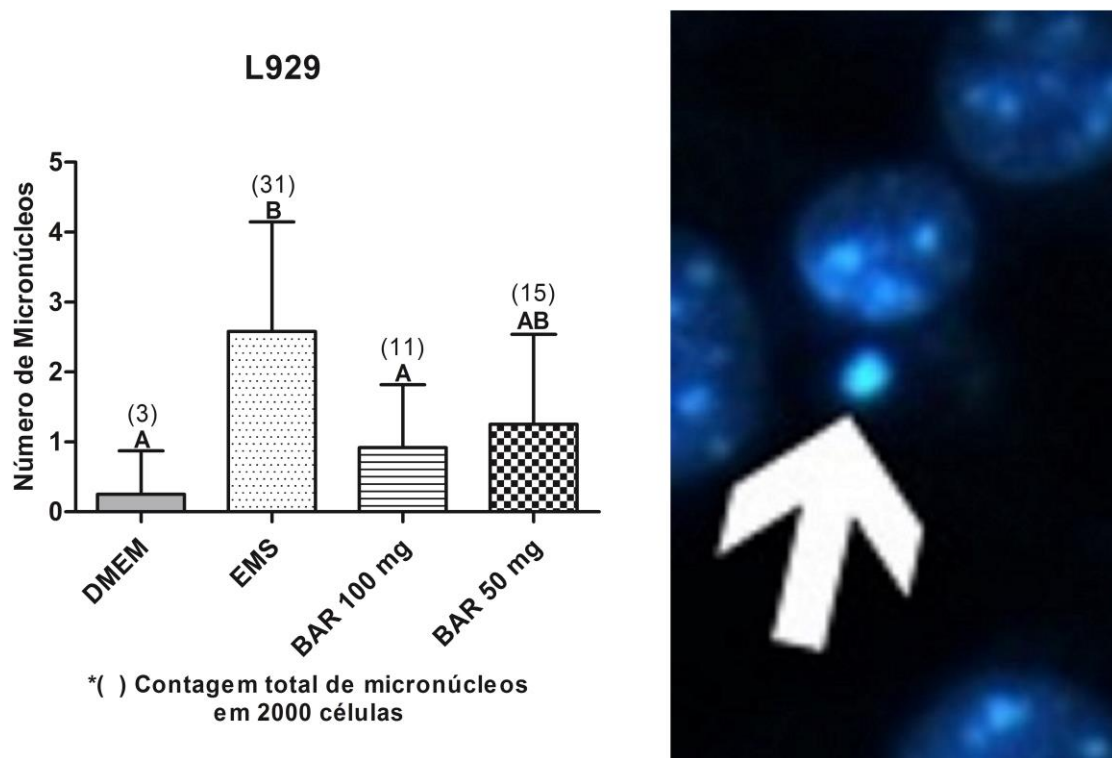


Legenda: Letras diferentes indicam grupos estatisticamente diferentes. (n = 3. ANOVA, teste de Tukey, $P \leq 0,05$).

Fonte: Elaborada pela autora.

A Figura 15 demonstra que a concentração de 50 mg/mL do extrato de barbatimão (15 MN) demonstrou atividade sobre o material genético de L929 estatisticamente semelhante tanto ao grupo tratado com meio DMEM (3 MN) quanto ao grupo tratado com EMS (31 MN). Já a concentração de 100 mg/mL (11 MN) foi semelhante ao grupo tratado com DMEM para essa linhagem celular.

Figura 15 - Valores médios ($\pm$ desvio padrão) da frequência de micronúcleos em fibroblastos murinos (L929) expostos ao extrato de barbatimão

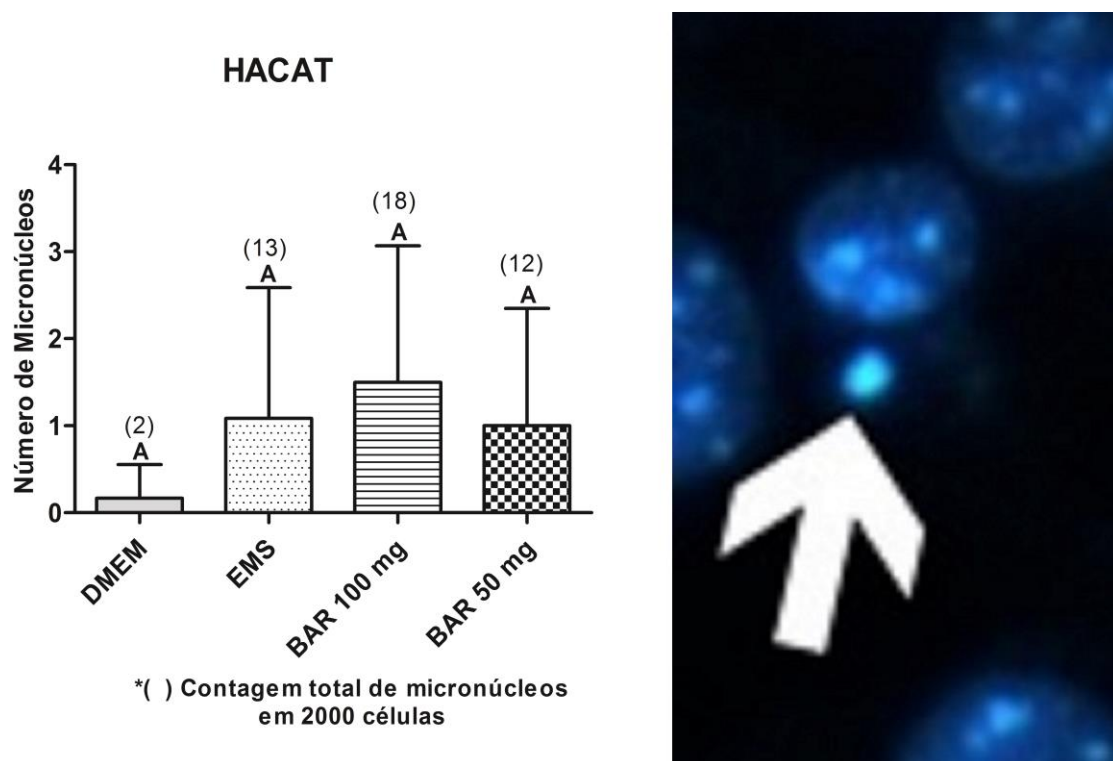


Legenda: Letras diferentes indicam grupos estatisticamente diferentes. ($n = 3$. ANOVA, teste de Tukey, $P \leq 0,05$).

Fonte: Elaborada pela autora.

A contagem de micronúcleos em queratinócitos humanos (HACAT) foi de 12 MN no grupo tratado com extrato vegetal na concentração de 50 mg/mL e 18 MN no grupo tratado com 100 mg/mL. A frequência do grupo tratado com DMEM foi de 2 MN e a do grupo tratado com EMS foi de 13 MN. Todas as frequências foram estatisticamente semelhantes conforme Figura 16.

Figura 16 - Valores médios ($\pm$ desvio padrão) da frequência de micronúcleos em queratinócitos humanos (HACAT) expostos ao extrato de barbatimão



Legenda: Letras diferentes indicam grupos estatisticamente diferentes. (n = 3. ANOVA, teste de Tukey, $P \leq 0,05$).

Fonte: Elaborada pela autora.

4.6 Atividade anti-inflamatória do extrato

Na figura 17A pode ser observado que a concentração de 100 mg/mL estimulou a síntese de IL-1 β acima do nível basal, porém abaixo do nível apresentado pelo grupo exposto apenas ao LPS. A concentração de 100 mg/mL não inibiu a síntese de IL-1 β no grupo com LPS, uma vez que os níveis desta citocina foram semelhantes ao grupo exposto ao LPS e não tratado com o extrato. A concentração de 50 mg/mL estimulou os macrófagos à liberação de IL-1 β acima do grupo induzido por LPS, bem como acima do nível de produção basal dos macrófagos não estimulados. Além disso, não foi capaz de inibir a produção de IL-1 β nos grupos tratados com 50 mg/mL do extrato vegetal e exposto ao LPS.

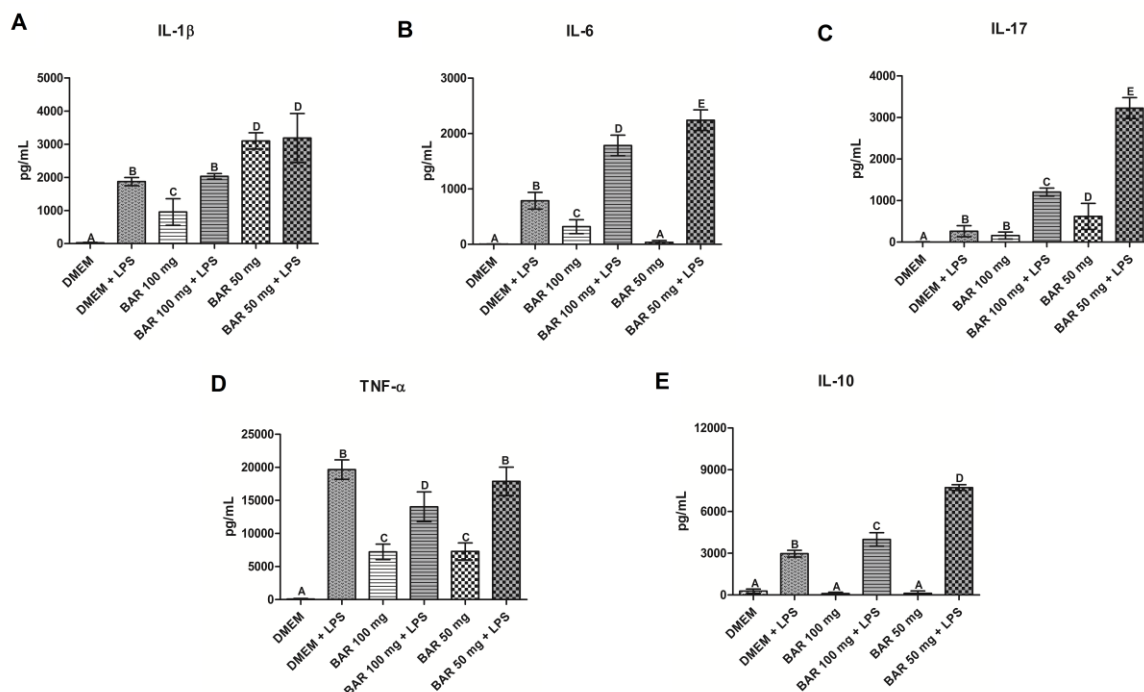
A síntese de IL-6 foi estimulada pelo extrato na concentração de 100 mg/mL, pois ficou acima do nível basal, porém se manteve abaixo da produção demonstrada pelo grupo estimulado apenas com o LPS. Por outro lado, essa concentração não inibiu a síntese de IL-6, uma vez que o nível dessa interleucina foi maior no grupo tratado com 100 mg/mL do extrato e exposto ao LPS do que no grupo que foi estimulado somente com o LPS. Na concentração de 50 mg/mL, o extrato de barbatimão não estimulou a liberação de IL-6 visto que o nível desse grupo foi semelhante ao nível basal, porém essa concentração não inibiu a síntese de IL-6 no grupo tratado com 50 mg/mL e exposto ao LPS, pois o nível de IL-6 foi mais alto nesse grupo do que no grupo exposto apenas ao LPS (Figura 17B).

A Figura 17C demonstra que o extrato de barbatimão na concentração de 100 mg/mL estimulou a liberação da IL-17 tanto quanto o LPS uma vez que o nível do grupo tratado somente com 100 mg/mL foi semelhante ao nível do grupo estimulado apenas com LPS. A concentração de 100 mg/mL não foi capaz de inibir a síntese de IL-17 uma vez que o nível dessa citocina no grupo tratado com essa concentração e exposto ao LPS foi maior do que o do grupo estimulado apenas com LPS. Em 50 mg/mL, o extrato estimulou a síntese de IL-17 e não inibiu sua liberação visto que o grupo tratado apenas com essa concentração e o grupo tratado com 50 mg/mL e exposto ao LPS demonstraram níveis de IL-17 maiores do que o do grupo estimulado somente com LPS.

Conforme a Figura 17D, o extrato de barbatimão aumentou a síntese de TNF- α acima do nível basal, porém abaixo do nível do grupo tratado apenas com LPS, nos grupos tratados com as concentrações de 100 ou 50 mg/mL e também no grupo tratado com 100 mg/mL e exposto ao LPS. O extrato vegetal não inibiu a síntese de TNF- α no grupo tratado com 50mg/mL e exposto ao LPS uma vez que o nível desta citocina apresentado por esse grupo foi semelhante ao nível demonstrado no grupo tratado somente com LPS.

Na Figura 17E pode-se observar que o extrato não estimulou a liberação da IL-10 tanto na concentração de 100 mg/mL quanto na de 50 mg/mL uma vez que os grupos tratados com estas concentrações apresentaram níveis semelhantes ao nível basal. Além disso, o extrato não foi capaz de inibir a liberação da IL-10, pois os grupos tratados com 100 ou 50 mg/mL do extrato e expostos ao LPS apresentaram níveis de IL-10 maiores que o nível do grupo tratado apenas com LPS.

Figura 17 - Efeito do extrato de *Stryphnodendron barbatiman* (Vell.) Mart. sobre a produção de citocinas em RAW 264.7 desafiados e não desafiados com LPS



Legenda: Letras diferentes indicam grupos estatisticamente diferentes. Valores médios $\pm$ desvio padrão (em pg/mL) de: A – IL-1 β , B – IL-6, C – IL-17, D – TNF- α e E – IL-10. (n = 8. ANOVA, teste de Tukey, $P \leq 0,05$).

Fonte: Elaborada pela autora.

5 DISCUSSÃO

A ampla resistência aos medicamentos antimicrobianos bem como o aumento na procura por medicamentos fitoterápicos levou a procura por novos fármacos, principalmente de origem vegetal, nos últimos anos. Para um medicamento ser aprovado para uso humano ele deve ser eficaz para o tratamento a que se propõe oferecendo os menores riscos possíveis à saúde e, preferencialmente, ser de baixo custo.

A análise fitoquímica do extrato de *S. barbatiman* (Vell.) Mart. demonstrou um teor de fenóis totais de 0,27%, abaixo do teor encontrado por Santos-Filho et al. (2011) em um extrato aquoso, uma fração aquosa do extrato e um extrato etanólico elaborados a partir das folhas de *S. adstringens* (Mart.) Coville que variou de 23,93 a 34,94%. Em relação ao teor de flavonoides totais, nesse estudo foi encontrado 1,937%, enquanto que no estudo de Santos-Filho et al. (2011) foi encontrado entre 3,63% a 6,44%. Os sólidos solúveis em etanol do extrato utilizado nesse estudo foi 7,06%. Não foram encontrados dados a respeito desse parâmetro na literatura consultada.

Para estabelecer a atividade antioxidante, esse estudo utilizou as substâncias referência própolis verde (11,33 µg/mL) e própolis vermelha (8 µg/mL). Quanto menor o valor encontrado nesse teste, mais alta é a atividade antioxidante da substância ou extrato estudado. A atividade antioxidante do extrato de barbatimão foi de 32,07 µg/mL, considerada alta. Todos os estudos consultados também relataram alta atividade antioxidante para extratos e frações de extratos feitos a partir tanto da casca do caule quanto das folhas de barbatimão (Santos-Filho et al., 2011; Pinto et al., 2015; Sabino et al., 2017).

Nesse estudo, sobre as culturas planctônicas a menor concentração bactericida do extrato vegetal encontrada foi de 50 mg/mL para *F. nucleatum*. Por outro lado, Miranda et al. (2008) relataram CIM $\geq$ 2 mg/mL de uma solução do extrato hidroalcoólico de barbatimão para *P. gingivalis*. Karygianni et al. (2014) avaliaram extratos das folhas e frutos da oliveira, da resina produzida pela aroeira e duas frações do extrato das partes aéreas de *I. viscosa* sobre *P. gingivalis*, *F. nucleatum* e *P. micra* e encontraram CIM variando de 0,07 a 10 mg/mL. Pathan et al.

(2017) testaram enxaguatório bucal comercial HiOra ([HiOra Mouthwash, Himalaya Drug Company, Bengaluru, India.], no qual cada grama apresenta: *Salvadora persica*, 5 mg; *Terminalia bellirica*, 10 mg; *Piper beetle*, 10 mg; *Mentha* spp 1,6 mg; *Trachyspermum ammi* 0,4 mg e óleo de *Gaultheria fragrantíssima* 1,2 mg e *Elettaria cardamomum* 0,2 mg) sobre *P. gingivalis* e *F. nucleatum* e encontraram CIM de 50 e 25 µg/mL, respectivamente.

Em um estudo que avaliou a atividade antisséptica do extrato de barbatimão sobre cepas de *S. aureus*, *S. epidermidis* e *E. coli*, não foi possível visualizar a turvação nos tubos para determinação da CIM por conta da coloração do extrato Souza et al. (2007), assim como ocorreu nesse estudo.

Por outro lado, os biofilmes foram susceptíveis à ação do extrato de *S. barbatiman* (Vell.) Mart. tendo uma redução mínima de 54% do biofilme de *P. endodontalis* após 24 h de exposição. Não foram encontrados na literatura estudos que relatassem o efeito de produtos do barbatimão sobre biofilmes dos micro-organismos anaeróbios avaliados nesse estudo, demonstrando a importância da apresentação destes resultados. Karched et al. (2015) avaliaram o comportamento de culturas planctônicas e biofilmes mono e polimicrobianos de seis espécies periodontais por oito dias, como *F. nucleatum*, *P. gingivalis* e *P. micra*. Os autores concluíram que, apesar de não terem a presença de colonizadores iniciais e serem colonizadores tardios, todas as espécies foram capazes de formar biofilme. Entretanto, esse estudo demonstrou que *F. nucleatum* e *P. micra* cresceram em maior quantidade nos biofilmes monomicrobianos enquanto que *P. gingivalis* teve o crescimento favorecido em biofilme polimicrobiano. Sabe-se que os biofilmes são estruturas multi espécies e que a presença de alguns micro-organismos pode alterar alguns fatores como virulência e resistência do biofilme (Jorge, 2012; Rôças, Siqueira Junior, 2018) o que poderia explicar a alta sensibilidade dos biofilmes testados nesse estudo frente ao extrato de barbatimão uma vez que eram todos mono espécie.

Embora não tenha sido possível encontrar estudos que tivessem relatado a ação de barbatimão sobre biofilmes de espécies periodontopatogênicas, na literatura podem ser encontrados trabalhos com outros produtos naturais, com destaque para suco concentrado de *cranberry* que não teve ação sobre biofilme de *P. gingivalis* formado por 48 h (Labrecque et al., 2006). Por outro lado, Yamanaka et al. (2007)

avaliaram a ação da fração fenólica de suco concentrado de *cranberry* sobre biofilme de duas espécies, *P. gingivalis* (cepas ATCC 33277 e FDC381) e *F. nucleatum* (cepas ATCC 25586, TDC 2 e TDC 20). As cepas foram combinadas entre si e o biofilme foi formado por 24 h. Os resultados mostraram redução de todos os biofilmes nas duas concentrações testadas, 250 e 500 µg/mL.

Três estudos utilizaram biofilmes polimicrobianos formados por *S. mutans*, *Streptococcus sobrinus*, *Lactobacillus rhamnosus*, *Actinomyces viscosus*, *P. gingivalis* e *F. nucleatum* por 64 h. Badet e Quero (2011) testaram dois tipos de mel de manuka (*Leptospermum scoparium*), o tipo 1 apresenta o fator exclusivo de manuka (FEM) de 30+ e o tipo 2 apresenta FEM de 16+. O FEM representa a potência antibacteriana do mel comparado a um anti-séptico padrão (fenol). Esse estudo demonstrou que ambos foram capazes de reduzir até 100% o biofilme polimicrobiano na concentração de 500 µg/mL, porém na concentração de 200 µg/mL o tipo 1 reduziu o biofilme totalmente e o tipo 2 apresentou uma leve redução do biofilme multi espécies. Furiga et al. (2008) testaram extrato de uva vermelha, de vinho tinto e da casca de pinheiro, todos polifenólicos, sobre o biofilme citado anteriormente. O extrato de vinho tinto não teve ação sobre o biofilme, porém os extratos de uva vermelha e de casca de pinheiro (2000 µg/mL) reduziram significativamente as bactérias, sendo que os estreptococos e as cepas anaeróbias foram os mais sensíveis. Em 2013, Furiga et al. avaliaram a ação de polifenóis de semente de uva (*Vitis vinifera*) e fluoreto de amina, separadamente e associados, sobre o biofilme citado anteriormente. Os autores relataram que todos os compostos reduziram significativamente as bactérias, mas a associação proporcionou maior índice de redução do biofilme, além disso os estreptococos e *P. gingivalis* foram as mais sensíveis.

Também foi demonstrado que o extrato etanólico de *Hottuynia cordata* reduziu o biofilme de *F. nucleatum* formado por 24 h de maneira dose dependente (Sekita et al., 2016) e o decocto das folhas dessa planta a 10% também inibiu significativamente a formação de biofilme de *F. nucleatum* (Sekita et al., 2017). Já os compostos derivados de plantas α -mangostin e lawsone metil éter reduziram significativamente o biofilme de *P. gingivalis* formado por 24 h de maneira dose dependente, e a associação dos dois compostos foi mais eficaz do que isolados na concentração de 12,5% (Nittayananta et al., 2018).

Em relação à citotoxicidade de *S. barbatiman* (Vell.) Mart., nesse estudo foi verificado que RAW 264.7 apresentou viabilidade celular entre 65,6 e 109,7% no tempo de exposição de 5 min e de 89,3 a 100,5% no tempo de 24 h. A linhagem L929 demonstrou viabilidade celular entre 50,5 e 69,2% em 5 min e de 100,1 a 112,8% em 24 h de exposição ao extrato. Os queratinócitos humanos da linhagem HACAT expostos por 5 min apresentaram entre 75,9 e 94,6% de viabilidade celular em 5 min e entre 42,5 e 134,4% em 24 h. A norma ISO 10993 trata da avaliação biológica de produtos para a saúde e estabelece que a viabilidade celular para testes *in vitro* deve ser $\geq 70\%$ para que a substância testada seja considerada segura, portanto, esses resultados demonstram que o extrato pode ser citotóxico num primeiro momento, porém em um contato prolongado o barbatimão tem um efeito proliferativo, evidenciado principalmente nos fibroblastos e queratinócitos, corroborando seu uso como cicatrizante. Ishida et al. (2006) verificaram que taninos provenientes da casca do caule de barbatimão foi pouco citotóxico para as linhagens celulares J774G8 e Vero pelo método da sulforodamina B, porém o ponto de corte desse estudo foi 50%. Oliveira et al. (2013) testaram o extrato da casca de *S. adstringens* (Mart.) Coville sobre RAW 264.7 pelo teste de MTT e descreveram viabilidade celular de 65% para a concentração de 12,5 mg/mL e acima de 70% para as outras concentrações testadas (50; 25 e 3,13 mg/mL). Outro estudo com extrato proveniente da casca de barbatimão e teste de MTT demonstrou viabilidade celular acima de 90% para a linhagem THP-1 (Henriques et al., 2016). Em 2017, Sabino et al. testaram o efeito citotóxico de um extrato feito a partir das folhas *S. barbatiman* (Vell.) Mart. sobre células de câncer de mama das linhagens MCF-7 e MDA-MB-435, e também, sobre cultura primária de células da medula de ratos pelo método da sulforodamina B e concluíram que o mesmo foi citotóxico sendo o ponto de corte 50%. Com isso, a maioria dos estudos consultados sobre a citotoxicidade de extratos de barbatimão, assim como o presente estudo, demonstram *in vitro* que seu uso é seguro.

Os ensaios sobre genotoxicidade do extrato de *S. barbatiman* (Vell.) Mart. foram realizados com as concentrações de 50 e 100 mg/mL que não foram genotóxicas para macrófagos murinos (RAW 264.7). Na concentração de 100 mg/mL, o extrato não foi genotóxico para fibroblastos murinos (L929), porém a 50 mg/mL foi constatada similaridade ao grupo exposto ao agente genotóxico EMS. Em

relação à genotoxicidade do extrato sobre queratinócitos humanos (HACAT), uma homogeneidade entre os grupos experimentais foi constatada. Todos os estudos sobre a atividade genotóxica ou antigenotóxica de *S. barbatiman* (Vell.) Mart. encontrados na literatura utilizam células da medula óssea de camundongos ou de ratos. Silva-de-Andrade et al. (2006) utilizaram o extrato etanólico de barbatimão nas concentrações de 50, 100 e 200 mg/Kg e verificaram que as duas concentrações mais altas reduziram a genotoxicidade causada pela mitomicina C. Outro estudo demonstrou que a fração rica em proantocianidinas da casca do caule de *S. adstringens* (Mart.) Coville não foi genotóxica nas doses de 750, 1500 e 2000 mg/Kg e ainda conferiu proteção ao material genético das células dos grupos tratados com ciclofosfamida na concentração de 750 mg/mL, a única testada para essa atividade (Costa et al., 2010). Em 2011, Santos-Filho et al. relataram a atividade antigenotóxica de extratos aquoso e etanólico das folhas de barbatimão sobre genotoxicidade causada por ciclofosfamida. Por outro lado, Chaves et al. (2017) concluíram que a solução aquosa de barbatimão (*S. adstringens* (Mart.) Coville) foi genotóxica na concentração de 30 mg/mL para eritrócitos de camundongos tratados com mitomicina C.

Na avaliação da atividade anti-inflamatória, foi possível observar que o extrato sem LPS só aumentou a liberação da IL-1 β e da IL-17 na concentração de 50 mg/mL em níveis mais altos do que o do grupo tratado apenas com LPS. Por outro lado, quando o extrato foi associado à estimulação com LPS houve aumento de todas as citocinas estudadas, menos do TNF- α que sofreu redução na concentração de 100 mg/mL, mas foi semelhante ao grupo tratado somente com LPS no grupo tratado com 50 mg/mL. Oliveira et al. (2013) também relataram aumento da IL-1 β em RAW 264.7 tratados com 50 mg/mL de extrato de barbatimão, porém nesse trabalho a mesma concentração reduziu a liberação de TNF- α o que não ocorreu no presente estudo. A redução de TNF- α também foi relatada por Henriques et al. (2016), esse estudo utilizou monócitos humanos (THP-1) e o extrato de *S. adstringens* (Mart.) Coville nas concentrações de 250, 125 e 62,5 μ g/mL. Autores sugeriram que exista um sinergismo entre extratos vegetais e LPS aumentando a resposta inflamatória (Henriques et al., 2016). Esse fenômeno também foi observado nesse estudo uma vez que todos os grupos contendo extrato de barbatimão e LPS induziram maior liberação de citocinas quando comparados

com os grupos tratados somente com a mesma concentração do extrato vegetal. Não foram encontrados estudos sobre a ação do barbatimão sobre outras citocinas na literatura.

Nesse estudo a liberação de IL-6 não foi aumentada pelo extrato na concentração de 50 mg/mL e foi pouco aumentada pela concentração de 100 mg/mL, uma vez que ficou entre o nível basal e o grupo estimulado apenas com LPS. Porém, nos grupos estimulados com LPS e tratados com o extrato vegetal nas concentrações de 50 e 100 mg/mL a liberação de IL-6 foi maior do que no grupo tratado apenas com LPS. Entretanto, sabe-se que essa interleucina apresenta tanto propriedades anti-inflamatórias quanto pró-inflamatórias. Estudos demonstraram que a IL-6 apresenta duas formas de ativação celular, a clássica e a trans-sinalização. A ativação clássica representa a ligação da interleucina ao seu receptor específico (IL-6R) presente nas membranas de hepatócitos, megacariócitos e alguns leucócitos, como os macrófagos. Já a trans-sinalização ocorre quando a IL-6 se liga à forma solúvel de IL-6R (sIL-6R) e esse complexo se liga a gp130 na superfície celular e ativa as células que não apresentam o IL-6R em suas membranas. Esses estudos sugerem que a ativação clássica gera respostas biológicas correspondentes à atividade anti-inflamatória enquanto a trans-sinalização induz respostas pró-inflamatórias (Opal, DePalo, 2000; Scheller et al., 2011; Wolf et al., 2014; Chiesa et al., 2015).

Os resultados obtidos para IL-17 demonstram que a liberação dessa interleucina foi estimulada pelo extrato de barbatimão uma vez que todos os grupos tratados com o extrato, adicionado ou não ao LPS, foram estatisticamente semelhantes ou superiores ao grupo tratado somente com LPS. Esse resultado pode ser decorrente do fato de que outras interleucinas, como IL-1 β , IL-6 e TNF, estimulam a produção da IL-17 (Zenobia, Hajishengallis, 2015; Abusleme, Moutsopoulos, 2017). Embora a IL-17 também possa apresentar propriedades anti-inflamatórias (Sadeghi et al., 2018), trata-se de uma citocina predominantemente pró-inflamatória. Estudos demonstram que a inflamação amplificada pela IL-17 facilita o estabelecimento de uma comunidade microbiana patogênica no ambiente bucal, favorecendo quadros de periodontite (Abusleme, Moutsopoulos, 2017).

A IL-10 se manteve em níveis basais nos grupos tratados somente com o extrato de barbatimão, porém nos grupos tratados com o extrato vegetal e LPS os

níveis dessa interleucina foram maiores do que o do grupo tratado somente com LPS, nesse estudo. A IL-10 é reconhecida como a principal citocina capaz de regular a atividade imunológica devido a suas propriedades imunossupressoras, pois, sabe-se que essa citocina inibe a produção de IL-1, TNF- α e outras quimiocinas. Porém, estudos demonstram que a IL-10 também pode apresentar atividades que aumentam a resposta imunológica, como: indução de células B e produção de anticorpos IgG, proliferação e ativação de células *Natural Killer* (NK) e aumento da citotoxicidade de linfócitos T CD8⁺ (Blackburn, Wherry, 2007; Cho et al., 2015; Geginat et al., 2016). Além disso, alguns estudos demonstram que, ao reduzir a resposta imunológica do hospedeiro, a IL-10 pode favorecer o estabelecimento de infecções virais crônicas especialmente de HIV, HBV e HCV (Blackburn, Wherry, 2007) e também pode dificultar a resolução de infecções bacterianas, fúngicas e virais, mas a resposta imune amplificada pelo bloqueio da IL-10 pode favorecer casos de choque séptico (Cho et al., 2015). Portanto, nem sempre seu aumento tem consequências desejáveis.

6 CONCLUSÃO

Esse estudo permitiu concluir que o extrato glicólico de *S. barbatiman* (Vell.) Mart.:

- a) Apresentou alta atividade antioxidante;
- b) Foi eficaz sobre biofilmes de *F. nucleatum*, *P. endodontalis*, *P. gingivalis* e *P. micra* reduzindo de 54 a 100% dos mesmos;
- c) Não foi citotóxico para macrófagos e fibroblastos murinos em 24 h de exposição, nem para queratinócitos humanos em 5 min e algumas concentrações (50 e 100 mg/mL) aumentaram a viabilidade dos queratinócitos em 24 h;
- d) Não foi genotóxico para a linhagem RAW 264.7. A concentração de 100 mg/mL não foi genotóxica para L929;
- e) O extrato reduziu a liberação da citocina pró-inflamatória TNF- α e aumentou a liberação das demais citocinas estudadas quando associado ao LPS.

REFERÊNCIAS*

Abusleme L, Moutsopoulos NM. IL-17: overview and role in oral immunity and microbiome. *Oral Dis*. 2017;23:854–65. doi:10.1111/odi.12598.

Agência Nacional de Vigilância Sanitária – ANVISA. Nota Técnica n. 003/2009/GEMAT/GGTPS/ANVISA de 27 de agosto de 2009. Solicitação dos ensaios previstos na Resolução RDC 55/2008, referente aos produtos implantáveis para dermopigmentação definitiva. Ministério da Saúde. Brasília: Agência Nacional de Vigilância Sanitária – ANVISA; 2009.

Agência Nacional de Vigilância Sanitária – ANVISA. Resolução RDC n. 26 de 13 de maio de 2014. Dispõe sobre o registro de medicamentos fitoterápicos e o registro e a notificação de produtos tradicionais fitoterápicos. Ministério da Saúde. Brasília: Agência Nacional de Vigilância Sanitária – ANVISA; 2014.

Araghizadeh A, Kohanteb J, Fani MM. Inhibitory activity of green tea (*Camellia sinensis*) extract on some clinically isolated cariogenic and periodontopathic bacteria. *Med Princ Pract*. 2013;22(4):368-72. doi: 10.1159/000348299.

Bachrach G, Jamil A, Naor R, Tal G, Ludmer Z, Steinberg D. Garlic allicin as a potential agent for controlling oral pathogens. *J Med Food*. 2011;14(11):1338-43. doi: 10.1089/jmf.2010.0165.

Badet C, Quero F. The *in vitro* effect of manuka honeys on growth and adherence of oral bacteria. *Anaerobe*. 2011;17:19-22. doi:10.1016/j.anaerobe.2010.12.007.

Bankova VS, Marcucci, MC. Standardization of propolis: present status and perspectives. *Bee World*. 2000;81(4):182-8. doi: 10.1080/0005772X.2000.11099492.

Blackburn SD, Wherry EJ. IL-10, T-cell exhaustion and viral persistence. *Trends Microbiol*. 2007;15(4):143-6. doi:10.1016/j.tim.2007.02.006.

Bostanci N, Belibasakis GN. *Porphyromonas gingivalis*: an invasive and evasive opportunistic oral pathogen. *Microbiol Lett*. 2012;333:1-9. doi: 10.1111/j.1574-6968.2012.02579.x.

Chaves DA, Lemes SR, Sousa MAM, Souza EGAR, Araújo LA, Mrué F, et al. Avaliação da atividade genotóxica e antigenotóxica do Barbatimão (*Stryphnodendron adstringens*). *EVS PUC GO*. 2017;44:56-61.

Chiesa C, Pacifico L, Natale F, Hofer N, Osborn JF, Resch B. Fetal and early neonatal interleukin-6 response. *Cytokine*. 2015;76:1–12. doi: 10.1016/j.cyto.2015.03.015.

Cho MJ, Ellebrecht CT, Payne AS. The dual nature of interleukin-10 in pemphigus vulgaris. *Cytokine*. 2015;73:335–41. doi: 10.1016/j.cyto.2014.11.002.

* 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 2017]. U.S. National Library of Medicine; [about 6 p.]. Disponível em: http://www.nlm.nih.gov/bsd/uniform_requirements.html

Clinical Laboratory Standards Institute - CLSI. Methods for antimicrobial susceptibility testing of anaerobic bacteria. Approved standard, CLSI document M11-A7. 7th ed. USA: Clinical Laboratory Standards Institute; 2007.

Costa MA, Ishida K, Kaplum V, Koslyk EDA, Mello JCP, Ueda-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, Dias Filho BP, 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;2013. doi:10.1155/2013/841580.

Ferreira SB, Palmeira JD, Souza JH, Almeida JM, Figueiredo MC, Pequeno AS, et al. Evaluation of the antimicrobial activity in vitro of the hydroalcoholic extract. *Stryphnodendron adstringens* against of *Staphylococcus aureus* strains. *Rev Bras Anál Clín*. 2010;42(1):27-31.

Furiga A, Lonvaud-Funel A, Dorignac G, Badet C. *In vitro* anti-bacterial and anti-adherence effects of natural polyphenolic compounds on oral bacteria. *J Appl Microbiol*. 2008;105:1470-6. doi:10.1111/j.1365-2672.2008.03882.x.

Furiga A, Roques C, Badet C. Preventive effects of an original combination of grape seed polyphenols with amine fluoride on dental biofilm formation and oxidative damage by oral bacteria. *J Appl Microbiol*. 2013;116:761-71. doi:10.1111/jam.12395.

Galimanas V, Hall MW, Singh N, Lynch MDJ, Goldberg M, Tenenbaum H, et al. Bacterial community composition of chronic periodontitis and novel oral sampling sites for detecting disease indicators. *Microbiome*. 2014;2:32. doi:10.1186/2049-2618-2-32.

Geginat J, Larghi P, Paroni M, Nizzoli J, Penatti A, Pagani M, et al. The light and the dark sides of interleukin-10 in immune-mediated diseases and cancer. *Cytokine Growth Factor Rev*. 2016;30:87–93. doi: 10.1016/j.cytogfr.2016.02.003.

Headland SE, Norling LV. The resolution of inflammation: principles and challenges. *Semin Immunol*. 2015;27:149–160. doi: 10.1016/j.smim.2015.03.014.

Henriques BO, Corrêa O, Azevedo EPC, Pádua RM, de Oliveira VLS, Oliveira THC, et al. In vitro TNF- α inhibitory activity of Brazilian plants and anti-inflammatory effect of *Stryphnodendron adstringens* in an acute arthritis model. *Evid Based Complement Alternat Med*. 2016(2016). doi: 10.1155/2016/9872598.

Inaba H, Amano A. Roles of oral bacteria in cardiovascular diseases — from molecular mechanisms to clinical cases: implication of periodontal diseases in development of systemic diseases. *J Pharmacol Sci*. 2010;113:103–9. doi: 10.1254/jphs.09R23FM.

Ishida K, Mello JC, Cortez DA, Dias Filho BP, Ueda-Nakamura T, Nakamura CV. Influence of tannins from *Stryphnodendron adstringens* on growth and virulence factors of *Candida albicans*. J Antimicrob Chemother. 2006;58:942–9. doi: 10.1093/jac/dkl377.

Jorge AOC. Microbiologia e imunologia oral. Rio de Janeiro: Elsevier; 2012.

Karched M, Bhardwaj RG, Inbamani A, Asikainen S. Quantitation of biofilm and planktonic life forms of coexisting periodontal species. Anaerobe. 2015;35:13-20. doi: 10.1016/j.anaerobe.2015.04.013.

Karygianni L, Cecere M, Skaltsounis AL, Argyropoulou A, Hellwig E, Aligiannis N, et al. High-level antimicrobial efficacy of representative Mediterranean natural plant extracts against oral microorganisms. Biomed Res Int. 2014;2014:839-019. doi: 10.1155/2014/839019.

Labrecque J, Bodet C, Chandad F, Grenier D. Effects of a high-molecular-weight cranberry fraction on growth, biofilm formation and adherence of *Porphyromonas gingivalis*. J Antimicrob Chemother. 2006;58:439-43. doi:10.1093/jac/dkl220.

Lima JC. Experimental evaluation of stem bark of *Stryphnodendron adstringens* (Mart). Coville for antiinflammatory. Phytother Res. 1998;12:218-20.

Lorenzi H, Matos FJ. Plantas medicinais do Brasil nativas e exóticas. São Paulo: Instituto Plantarum; 2002.

Maroni BC, Di Stasi LC, Machado SR. Plantas medicinais do cerrado de Botucatu, guia ilustrado. São Paulo: UNESP; 2006.

Miranda MA, Martins CHG, Silva MLA, Froner IC, Rosa DC. Avaliação da atividade antimicrobiana das soluções do barbatimão, da mamona e da clorexidina a 2% em microorganismos anaeróbios. Bras Oral Res. 2008;22(1):271.

Nittayananta W, Limsuwan S, Srichana T, Sae-Wong C, Amnuaikit T. Oral spray containing plant-derived compounds is effective against common oral pathogens. Arch Oral Biol. 2018;90:80-5. doi: 10.1016/j.archoralbio.2018.03.002.

Okuda T, Kokubua E, Kawana T, Saitob A, Okuda K, Ishihara K. Synergy in biofilm formation between *Fusobacterium nucleatum* and *Prevotella* species. Anaerobe. 2012;18:110-6. doi:10.1016/j.anaerobe.2011.09.003

Oliveira JR, de Castro VC, das Graças Figueiredo Vilela P, Camargo SE, Carvalho CA, Jorge AO, de Oliveira LD. 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.

Opal SM, DePalo VA. Anti-inflammatory cytokines. Chest. 2000 Apr;117(4):1162-72.

Organisation for Economic Cooperation and Development - OECD, *Test No. 487: In Vitro Mammalian Cell Micronucleus Test*. Paris: OECD Publishing; 2014. doi: 10.1787/9789264091016-en.

Özok AR, Wu M-K, Luppens SBI, Wesselink PR. Comparison of growth and susceptibility to sodium hypochlorite of mono- and dual-species biofilms of *Fusobacterium nucleatum* and *Peptostreptococcus (micromonas) micros*. J Endod. 2007;7:819-22. doi:10.1016/j.joen.2007.03.008.

Pathan MM, Bhat KG, Joshi VM. Comparative evaluation of the efficacy of a herbal mouthwash and chlorhexidine mouthwash on select periodontal pathogens: An *in vitro* and *ex vivo* study. J Indian Soc Periodontol. 2017 Jul-Aug;21(4):270–5. doi: 10.4103/jisp.jisp_382_16.

Pereira EM, Gomes RT, Freire NR, Aguiar EG, Brandão MG, Santos VR. In vitro antimicrobial activity of Brazilian medicinal plant extracts against pathogenic microorganisms of interest to dentistry. Planta Med. 2011;77:401–4. doi: 10.1055/s-0030-1250354.

Pérez-Chaparro PJ, McCulloch JA, Mamizuka EM, Moraes ACL, Faveri M, Figueiredo LC, et al. Do different probing depths exhibit striking differences in microbial profiles? J Clin Periodontol. 2018;45:26–37. doi: 10.1111/jcpe.12811.

Pinto SCG, Bueno FG, Panizzon GP, Morais G, Santos PVP, Baesso ML, et al. *Stryphnodendron adstringens*: clarifying wound healing in streptozotocin-induced diabetic rats. Planta Med. 2015;81:1090-6. doi: http://dx.doi.org/10.1055/s-0035-1546209

Praveen NC, Rajesh A, Madan M, Chaurasia VR, Hiremath NV, Sharma AM. In vitro evaluation of antibacterial efficacy of pineapple extract (Bromelain) on periodontal pathogens. J Int Oral Health. 2014 Sep;6(5):96-8.

Rio RGW. Métodos de controle químico de amostras de própolis [dissertação]. São Paulo: Universidade de São Paulo – USP, Instituto de Ciências Biológicas da USP; 1996.

Rôças IN, Siqueira Junior, JF. Frequency and levels of candidate endodontic pathogens in acute apical abscesses as compared to asymptomatic apical periodontitis. PLoS ONE. 2018;13(1): e0190469. doi: 10.1371/journal.pone.0190469

Sabino APL, Eustáquio LMS, Miranda ACF, Biojone C, Mariosa TN, Gouvêa CMCP. *Stryphnodendron adstringens* (Barbatimão) leaf fraction: chemical characterization, antioxidant activity and cytotoxicity towards human breast cancer cell lines. Appl Biochem Biotechnol. 2017. doi: 10.1007/s12010-017-2632-z.

Sadeghi R, Sattari M, Dehghan M, Akbari S. Interleukin-17 and interleukin-23 levels in gingival crevicular fluid of patients with chronic and aggressive periodontitis. Centr Eur J Immunol. 2018;43(1):76-80. doi: 10.5114/ceji.2018.74876.

Santana BF, Voeks RA, Funch LS. Ethnomedicinal Survey of a maroon community in Brazil's Atlantic tropical forest. *J Ethnopharmacol.* 2016;181:37-49. doi: 10.1016/j.jep.2016.01.014.

Santos-Filho PR, Ferreira LA, Gouvêa CMCP. Protective action against chemical-induced genotoxicity and free radical scavenging activities of *Stryphnodendron adstringens* ("barbatimão") leaf extracts. *Braz J Pharmacog.* 2011;21(6):1000-5. doi: 10.1590/S0102-695X2011005000176.

Scheller J, Chalaris A, Schmidt-Arras D, Rose-John S. The pro- and anti-inflammatory properties of the interleukin-6. *Biochim Bioph Acta.* 2011;1813:878–88. doi:10.1016/j.bbamcr.2011.01.034.

Sekita Y, Murakami K, Yumoto H, Amoh T, Fujiwara N, Ogata S, et al. Preventive effects of *Houttuynia cordata* extract for oral infectious diseases. *BioMed Res Int.* 2016(2016). doi: 10.1155/2016/2581876.

Sekita Y, Murakami K, Yumoto H, Hirao K, Amoh T, Fujiwara N, et al. Antibiofilm and anti-inflammatory activities of *Houttuynia cordata* decoction for oral care. *Evid Based Complement Alternat Med.* 2017(2017). doi: 10.1155/2017/2850947.

Silva-de-Andrade L, Barros-de-Castro D, Chen-Chen L. Efeito modulador do extrato de *Stryphnodendron adstringens* Mart. (barbatimão) contra danos induzidos pela mitomicina C em camundongos. *J Braz Soc Ecotoxicol.* 2006;1(2):127-30. doi: 10.5132/jbse.2006.02.007.

Simões CO, Schenkel EP, Gosmann G, Mello JC, Mentz LA, Petrovick PR. *Farmacognosia da planta ao medicamento.* Florianópolis: UFRGS Editora; 1999.

Souza TM, Moreira RRD, Pietro RCLR, Isaac VLB. Avaliação da atividade anti-séptica de extrato seco de *Stryphnodendron adstringens* (Mart.) Coville e de preparação cosmética contendo esse extrato. *Braz J Pharmacog.* 2007;17(1):71-5.

Tamai R, Sugamata M, Kiyoura Y. *Candida albicans* enhances invasion of human gingival epithelial cells and gingival fibroblasts by *Porphyromonas gingivalis*. *Microb Pathog.* 2011;51:250-4. doi: 10.1016/j.micpath.2011.06.009.

Veiga RS, Mendonça S, Mendes PB, Paulino N, Mimica MJ, Lagareiro Netto AA, et al. Artepillin C and phenolic compounds responsible for antimicrobial and antioxidant activity of green propolis and *Baccharis dracunculifolia* DC. *J Appl Microbiol.* 2017 Apr;122(4):911-920. doi: 10.1111/jam.13400.

Wolf J, Rose-John S, Garbers C. Interleukin-6 and its receptors: a high regulated and dynamic system. *Cytokine.* 2014;70:11–20. doi: 10.1016/j.cyto.2014.05.024.

Yamanaka A, Kouchi T, Kasai K, Kato T, Ishihara K, Okuda K. Inhibitory effect of cranberry polyphenol on biofilm formation and cysteine proteases of *Porphyromonas gingivalis*. *J Periodont Res.* 2007;42:589-92. doi:10.1111/j.1600-0765.2007.00982.x.

Zenobia C, Hajishengallis G. Basic biology and role of interleukin-17 in immunity and inflammation. *Periodontol 2000*. 2015 Oct;69(1):142–59. doi:10.1111/prd.12083.

ANEXO A – Laudo do fabricante do extrato glicólico de barbatimão



EXTRATO GLICÓLICO DE BARBATIMÃO

Nome Científico: *Stryphnodendron barbatiman M* / Leguminosae STRYPHNODENDRON
INCI: Barbatiman Extract
Nº CAS: 57-55-6; 64-17-5; 7732-18-5; 26172-55-4/2682-20-4; 99-76-3
Parte Utilizada: Casca
Fórmula Molecular: N.A
Peso Molecular: N.A

PRINCÍPIOS ATIVOS

Planta rica em tanino (chega até 50%), substância corante (avermelhada).

PROPRIEDADES E EMPREGOS TERAPÊUTICOS

O Extrato Glicólico de Barbatimão tem ação adstringente, anti-séptica, antiinflamatória.

Utilizado em preparações capilares no combate a oleosidade, caspa e seborréia, em produtos para afecções da pele e mucosa.

Poderá ser incorporado em: cremes, loções cremosas e hidroalcoólicas, em shampoos, géis, sabonetes, máscaras faciais, loções de limpeza e outros produtos cosméticos.

Indicado somente para uso externo em concentrações de até 5%.

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

ESTOCAGEM E VALIDADE

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

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

Obs.:

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

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Alonso, J.R.; Tratado de Fitomedicina–Bases Clínicas e Farmacológicas. ISIS Ediciones SRL, 1998.

Balmé, F.; Plantas Medicinais. Ed. Helmus, 1994.

Coimbra, R.; Manual de Fitoterapia. Ed. CEJUP, 1994.