RESSALVA

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

23/10/2019

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.

Ficha catalográfica elaborada pela Biblioteca Prof. Achille Bassi e Seção Técnica de Informática, ICMC/USP
com adaptações - STATI, STRAUD e DTI do ICT/UNESP.
Renata Aparecida Couto Martins CRB-8/8376

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 *S. barbatiman* (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 (± desvio padrão) de UFC/mL e percentual de redução de biofilmes de *Fusobacterium nucleatum* expostos ao extrato de barbatimão..... 35

Figura 8 – Valores médios (± desvio padrão) de UFC/mL e percentual de redução de biofilmes de *Porphyromonas endodontalis* expostos ao extrato de barbatimão..... 36

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

de barbatimão..... 37

Figura 10 - Valores médios (± desvio padrão) de UFC/mL e percentual de redução de biofilmes de *Parvimonas micra* expostos ao extrato de barbatimão..... 38

Figura 11- Valores médios (± desvio padrão) da viabilidade celular de macrófagos murinos (RAW 264.7) expostos ao extrato de barbatimão..... 39

Figura 12 – Valores médios (± desvio padrão) da viabilidade celular de fibroblastos murinos (L929) expostos ao extrato de barbatimão..... 39

Figura 13 – Valores médios (± desvio padrão) da viabilidade celular de queratinócitos humanos (HACAT) expostos ao extrato de barbatimão..... 40

Figura 14 - Valores médios (± desvio padrão) da frequência de micronúcleos em macrófagos murinos (RAW 264.7) expostos ao extrato de barbatimão..... 41

Figura 15 - Valores médios (± desvio padrão) da frequência de micronúcleos em fibroblastos murinos (L929) expostos ao extrato de barbatimão..... 42

Figura 16 - Valores médios (± desvio padrão) da frequência de micronúcleos em queratinócitos humanos (HACAT) expostos ao extrato de barbatimão..... 43

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..... 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-1β, 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-1β, 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 metaloproteinases de matriz e liberação de lipopolissacarídeos (LPS) que estimulam a produção de interleucina 1 alfa (IL-1α) 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. gengivalis* 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-1β. 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-1β e todos reduziram a quantidade de TNF-α, porém o nível basal de TNF-α estava mais elevado que o da IL-1β.

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 homeostásicos (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 traseiro 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 intracanais entre outros são necessárias.

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. nucletaum*, *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-sépticade 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 epitelial 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.