

JONATAS RAFAEL DE OLIVEIRA

ENSAIO DE CITOTOXICIDADE DE EXTRATOS NATURAIS
APÓS DETERMINAÇÃO DA
CONCENTRAÇÃO MICROBICIDA MÍNIMA PARA
Staphylococcus spp., Streptococcus mutans E Candida spp.



2011

JONATAS RAFAEL DE OLIVEIRA

**ENSAIO DE CITOTOXICIDADE DE EXTRATOS NATURAIS
APÓS DETERMINAÇÃO DA
CONCENTRAÇÃO MICROBICIDA MÍNIMA PARA
Staphylococcus spp., *Streptococcus mutans* E *Candida* spp.**

Dissertação apresentada à Faculdade de Odontologia, Campus de São José dos Campos, UNESP – Univ Estadual Paulista, como parte dos requisitos para obtenção do título de MESTRE, pelo Programa de Pós-Graduação em BIOPATOLOGIA BUCAL, Área Microbiologia / Imunologia.

Orientadora: Profa. Dra. Luciane Dias de Oliveira
Co-orientadora: Profa. Dra. Luana Marotta Reis de Vasconcellos

São José dos Campos

2011

Apresentação gráfica e normalização de acordo com:
Alvarez S, Coelho DCAG, Couto RAO, Durante APM. Guia prático para
Normalização de Trabalhos Acadêmicos da FOSJC. São José dos
Campos: FOSJC/UNESP; 2010.

O4e Oliveira, Jonatas Rafael de.
Ensaio de citotoxicidade de extratos naturais após determinação da
concentração microbicida mínima para *Staphylococcus* spp., *Streptococcus*
mutans e *Candida* spp/ Jonatas Rafael de Oliveira. __ São José dos Campos
: [s.n.], 2011
134 f.: il.

Dissertação (Mestrado em Biopatologia Bucal) – Faculdade de Odontologia
de São Jose dos Campos, Universidade Estadual Paulista, 2011.

Orientador: Profa. Dra. Luciane Dias de Oliveira

Co-orientador: Profa. Dra. Luana Marotta Reis de Vasconcellos

1. Equisetum arvense. 2. Glycyrrhiza. 3. Granatum. 4. Stryphnodendron
barbatimam. 5. Produtos com ação antimicrobiana. 6. Citotoxicidade.. 7.
Citocinas. I. Oliveira Luciane Dias de. II. Universidade Estadual Paulista.
Faculdade de Odontologia de São José dos Campos. III. Título

tD17

Ficha catalográfica elaborada pelo Serviço Técnico de Biblioteca e Documentação da
Faculdade de Odontologia de São José dos Campos – UNESP

AUTORIZAÇÃO

Autorizo a reprodução e divulgação total ou parcial deste trabalho, por qualquer
meio convencional ou eletrônico, desde que citada a fonte.

São José dos Campos, 23 de maio de 2011.

Assinatura : 

E-mail: jroliveira16@hotmail.com

BANCA EXAMINADORA

Profa. Dra. Luciane Dias de Oliveira (Orientadora)

Faculdade de Odontologia de São José dos Campos

UNESP – Univ Estadual Paulista

Profa. Adj. Rosilene Fernandes da Rocha

Faculdade de Odontologia de São José dos Campos

UNESP – Univ Estadual Paulista

Profa. Dra. Mariella Vieira Pereira Leão

Instituto Básico de Biociências

Universidade de Taubaté – UNITAU

São José dos Campos, 14 de junho de 2011.

DEDICATÓRIA

Esta obra eu dedico inteiramente a Deus.

Desde o ingresso à Pós-graduação até a presente data tenho sido amparado, conduzido e confortado por Aquele que me permitiu realizar mais este sonho em minha vida.

Mesmo eu estando em falta Contigo, o Senhor nunca deixou de olhar por mim, como um Pai amoroso que és, de colocar em minha vida pessoas generosas e amigas para me ajudar, para me fazer rir, para me fazer lembrar de meus objetivos, o quanto devo insistir e persistir, trazendo a minha memória que as adversidades vem para dar experiência. O Senhor sempre me enviou inspiração, força e ânimo, muitas vezes me achei extremamente incapacitado, então veio o Senhor e me confortou, justamente o Senhor que é criador de tudo, o detentor de todo o conhecimento. Muito obrigado.

Por isso e por outros motivos tenho o prazer em Lhe dedicar este trabalho. Ao Senhor, sejam dadas todas as honras.

AGRADECIMENTOS ESPECIAIS

Pai, mãe e família

Ofereço aos meus queridos pais, **Leila** e **Sebastião** (Marcelo), meus sinceros e plenos agradecimentos por sempre apoiarem as minhas decisões. Por cada palavra de sabedoria e encorajamento ofertada a mim. É justamente isso, acompanhado de carinho, amor e compreensão, que me faz prosseguir sempre. Muito obrigado por estarem comigo na realização deste sonho. Às minhas queridas irmãs, **Silvana**, **Sueli** e **Simone**, pelo carinho e constante apoio prestado a mim, em relação a minha carreira profissional. Aos meus queridos sobrinhos **Paulinho**, **Felipe**, **Caique**, **Nathália**, **Gabriela**, **Otávio** e **Gabriel** por cada demonstração de admiração e carinho por mim. Amo muito vocês. Aos meus cunhados **Vanderlei**, **Donizeti** e **Manoel**, pelo incentivo.

Profa. Dra. Luciane Dias de Oliveira

Lu, mesmo sem me conhecer você aceitou ser minha orientadora, depositou em mim confiança, acreditou em mim, permitiu que eu amadurecesse profissionalmente, me ensinando sempre com sua forma correta e ética de ser. Talvez sem você saber, você me deixou como ensinamento que a força de vontade, humildade e a persistência são alguns dos ingredientes para o sucesso. Muito obrigado pela paciência, por cada sorriso, por cada palavra positiva e de incentivo e pela amizade.

Polyana das Graças Figueiredo Vilela (doutoranda pelo Programa em Biopatologia Bucal)

Com você eu não aprendi apenas à cultivar células e a fazer ELISA, foi muito mais que isso. Com você eu aprendi que cultivar novas amizades

vale à pena, que o jargão “a primeira impressão é a que fica” não se aplica à todas situações. Lembra-se de como começamos nossa amizade, se pudermos chamar assim? Graças a Deus, tudo mudou em questão de algumas semanas, nossa amizade agora parece ser de infância e notei que somos bem parecidos na forma de perceber e conduzir as coisas. Poly, a você minha total gratidão, pela sua amizade, pela sua generosidade incondicional, pelo seu apoio, por sempre dizer palavras confortantes, pela cumplicidade, por me compreender, por cada gesto de carinho. Você certamente faz parte do grupo de pessoas que pretendo levar no coração por toda minha vida.

Rosilene Batista de Aguiar Almeida (doutora pelo Programa em Biopatologia Bucal)

Às vezes precisamos de alguém que nos impulse, e foi exatamente isso que você fez a mim. Por isso quero prestar esta pequena homenagem, porém muito sincera a você Rosi. Meus agradecimentos pela sua dedicação, paciência e bondade nos momentos que transmitiu a mim tudo aquilo que você aprendeu sobre as metodologias de Microbiologia, obrigado por cada detalhe ensinado. Foi muito importante para mim ter conhecido uma pessoa como você Rosi, humilde, amiga e muito prestativa e positiva. Que nossa amizade perdure e sobreviva ao tempo e à distância.

Amigos especiais

Querida amiga Marta, foi ótimo ter lhe conhecido. É maravilhoso estar com pessoas que entendem suas angústias e melhor ainda estar com aquelas que te ajudam a superar as dificuldades. Você é uma delas. Obrigado Martinha por cada minuto de descontração, principalmente na hora do cafezinho. Espero que tenha uma brilhante carreira como professora.

Querida amiga Monique, você faz parte da minha história desde a nossa graduação e não poderia deixar de te agradecer por sua amizade e por todos os momentos que me faz sorrir. Aprendo muito com você. Obrigado pelo seu carinho e amizade.

Querido amigo Douglas, você é meu irmão do coração e às vezes a amizade do coração fala mais alta que qualquer laço sanguíneo. Obrigado pela sua admiração e amizade. A pós-graduação te espera, tenho certeza que terá um futuro brilhante na área que escolheu para atuar.

AGRADECIMENTOS

À **Universidade Estadual Paulista “Julio de Mesquita Filho” - UNESP**, na pessoa do diretor da Faculdade de Odontologia de São José dos Campos, Prof. Adj. José Roberto Rodrigues e do vice-diretor Prof. Dr. Carlos Augusto Pavanelli.

Ao **Programa de Pós-graduação em Biopatologia Bucal**, na pessoa da coordenadora Prof. Adj. Cristiane Yumi Koga-Ito.

À **Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES)** pela bolsa de estudo concedida.

Aos **docentes do Programa de Pós-graduação em Biopatologia Bucal**.

Aos **prezados docentes da área de Microbiologia e Imunologia**, pela recepção muito amistosa que tive no Programa e no Laboratório de Microbiologia e Imunologia. Obrigado pela oportunidade, saibam que vocês tem a minha total admiração.

- **Prof. Tit. Antonio Olavo Cardoso Jorge**, pela disposição a qualquer hora em ajudar, em esclarecer qualquer tipo de dúvida, por sempre estar disposto a ensinar e a orientar, até mesmo nos momentos de descontração, de conversas na hora do café, de trocas de experiência. Foi ótimo ter tido o senhor como professor.

- **Profa. Dra. Juliana Campos Junqueira**, por toda ajuda oferecida, acompanhada com muito carisma, sempre que solicitada.

- **Profa. Adj. Cristiane Yumi Koga-Ito**, pela agradável convivência neste período do curso e também por sempre estar à disposição nos esclarecimentos de dúvidas sejam elas burocráticas, relacionada à Pós-graduação ou à Microbiologia.

À **Profa. Adj. Rosilene Fernandes da Rocha**, da Farmacologia, que me ofereceu a oportunidade de conhecer um pouco do universo dos fármacos quando me aceitou no Estágio Docência, pela amizade e pelas palavras de incentivo.

À **Profa. Dra. Samira Esteves Afonso Camargo**, da Bioquímica, pela importantíssima ajuda oferecida quanto ao protocolo de MTT, por ter me orientado quanto aos detalhes do método, pela disposição a qualquer hora nos esclarecimentos de dúvida e também amizade.

Ao **Prof. Dr. Cláudio A. Talge Carvalho**, da Endotondia, pela amizade e convívio agradável.

A **Profa. Dra. Luana M. R. de Vasconcellos**, da Histologia, pela amizade.

A **todos da Secretaria de Pós-graduação**, Rose, Erena, Cidinha e Bruno, pelo importante suporte que oferecem a todos os pós-graduandos.

Aos **técnicos Sérgio e Domingos** do Laboratório de Microbiologia e Imunologia pela colaboração oferecida.

À **Ana Paula** pelo agradável convívio e deliciosos cafés que nos davam energia e infelizmente acabavam rapidamente.

A **todos os funcionários da FOSJC – UNESP** que colaboraram direta ou indiretamente.

Ao **aluno de Iniciação Científica Vinícius Carlos de Castro**, por ter colaborado com dedicação para a realização prática deste Projeto, pelo agradável convívio e amizade. Sua ajuda foi extremamente fundamental, espero ter a oportunidade de trabalhar com você novamente.

À **Emanuele Gonçalves Brito (mestre pelo Programa em Biopatologia Bucal)**, por ter me oferecido os extratos naturais utilizados neste trabalho. Obrigado pelo apoio, amizade e convivência, mesmo que tenha sido por um breve período tempo.

À **Alessandra Sverberi Carvalho (doutora pelo Programa em Odontologia Restauradora)**, pelos momentos de descontração, risos e amizade. Todos os procedimentos minuciosos e maçantes de um protocolo científico ficam mais prazerosos de serem cumpridos quando se tem pessoas tão alto-astral como você do lado. Alê, muito sucesso na sua vida profissional e pessoal. Aprendi muito com sua humildade.

À **Vanessa Maria de Campos Rasteiro**, pela amizade, pelas palavras de incentivo, desabafos e pelos momentos de alegria e descontração no laboratório. Foi ótimo ter realizado o trabalho de crédito com você.

Às **amizades feitas neste período (entre amigos e colegas que chegam e que vão para trilharem novos caminhos)**: (em ordem alfabética) Adeline, Adriana Chung (Endodontia), Alessandra (Endodontia), Aline, Ana Karina, Bete, Bruno, Carol Borges, Carol Sálvia,

Chibebe, Cristiane, Daniel Freitas, Emanuele, Fernanda Brighenti, Flávio, Gleyce (Endodontia), Graziella, Guilherme, Isabel (Patologia), Ivani (Proac), João César (Radiologia), Jorgiana, Lírian (Proac), Luana Galvão (Patologia), Marta, Michelle Penelluppi, Michele Cardoso (Patologia), Natália (Proac), Néia, Polyana, Rafaella (Proac), Raffaella (Endodontia), Renata (Prótese), Rosi, Simone, Tatiana (Endodontia) e Vanessa.

A todos os colegas dos Programas de Pós-graduação em Biopatologia Bucal e Restauradora.

A vocês meus sinceros votos de uma vida feliz.

*O Senhor mandará que a bênção esteja contigo nos teus celeiros
e em tudo que puseres a tua mão;
e te abençoará na terra que te der o Senhor, teu Deus.
(Deuteronômio 28.8)*

SUMÁRIO

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS	15
RESUMO	17
ABSTRACT	19
1 INTRODUÇÃO	21
2 REVISÃO DA LITERATURA	24
2.1 Grupos de microrganismos alvos da pesquisa	24
2.1.1 <i>Staphylococcus aureus</i>	24
2.1.2 <i>Staphylococcus epidermidis</i>	27
2.1.3 <i>Streptococcus mutans</i>	29
2.1.4 Leveduras do gênero <i>Candida</i>	30
2.2 Fitoterápicos	31
2.3 Plantas medicinais.....	33
2.4 Atividade antimicrobiana de plantas medicinais	35
2.4.1 <i>Equisetum arvense</i> L. (Cavalinha)	36
2.4.2 <i>Glycyrrhiza glabra</i> L. (Alcaçuz)	37
2.4.3 <i>Punica granatum</i> L. (Romã).....	39
2.4.4 <i>Stryphnodendron barbatimam</i> Mart. (Barbatimão).....	41
2.5 Citotoxicidade	42
3 PROPOSIÇÃO.....	46
4 MATERIAIS E MÉTODOS.....	47
4.1 Extratos naturais.....	47
4.1.1 Obtenção dos extratos.....	47
4.2 Padronização dos inóculos para teste de diluição em caldo.....	48
4.2.1 Microrganismos.....	48
4.2.2 Preparação dos inóculos de <i>S. aureus</i> e <i>S. epidermidis</i>	49
4.2.3 Preparação dos inóculos de <i>Streptococcus mutans</i>	50

4.2.4 Preparação dos inóculos de <i>Candida</i> spp.....	51
4.3 Teste de microdiluição em caldo.....	51
4.3.1 Meios de cultura.....	52
4.3.2 Disposição nas placas de microdiluição	52
4.4 Avaliação da citotoxicidade dos extratos naturais	54
4.4.1 Cultivo de cultura celular de macrófagos (RAW 264.7)	55
4.4.2 Contagem de células viáveis	58
4.4.3 Ensaio de citotoxicidade dos extratos naturais com MTT	59
4.4.4 Ensaio de citotoxicidade dos extratos naturais pela produção de citocinas IL-1 β e TNF- α por macrófagos	62
4.4.4.1 Ensaio Imunoenzimático ELISA.....	64
4.5 Análise Estatística	66
5 RESULTADOS	67
5.1 Concentração Microbicida Mínima (CMM) dos extratos naturais ...	67
5.1.1 <i>Equisetum arvense</i> L. (cavalinha)	67
5.1.2 <i>Glycyrrhiza glabra</i> L. (alcaçuz)	69
5.1.3 <i>Punica granatum</i> L. (romã)	72
5.1.4 <i>Stryphnodendron barbatimam</i> Mart. (barbatimão)	74
5.2 Citotoxicidade dos extratos naturais com MTT	77
5.2.1 <i>Equisetum arvense</i> L. (cavalinha)	77
5.2.2 <i>Glycyrrhiza glabra</i> L. (alcaçuz)	79
5.2.3 <i>Punica granatum</i> L. (romã)	82
5.2.4 <i>Stryphnodendron barbatimam</i> Mart. (barbatimão)	84
5.3 Citotoxicidade dos extratos naturais pela produção de citocinas IL-1β e TNF-α	86
5.3.1 Produção de IL-1 β	86
5.3.1 Produção de TNF- α	88
6 DISCUSSÃO	91
6.1 Atividade antimicrobiana de extratos naturais	91
6.1.1 Metodologia	91
6.1.2 Resultados	93

6.2 Citotoxicidade dos extratos naturais	98
6.2.1 Metodologia	98
6.2.2 Resultados	99
6.3 Produção de citocinas em culturas de macrófagos	105
6.3.1 Metodologia	105
6.3.2 Resultados	106
7 CONCLUSÃO	112
8 REFERÊNCIAS	114
ANEXOS	133

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ANVISA	= Agência Nacional de Vigilância Sanitária
ATCC	= <i>American Type Culture Collection</i>
BHI	= <i>Brain Heart Infusion</i> (Infusão Cérebro Coração)
BSA	= Soro Albumina Bovino
Ca	= Cálcio
CBM	= Concentração Bactericida Mínima
CFM	= Concentração Fungicida Mínima
CIM	= Concentração Inibitória Mínima
CMM	= Concentração Microbicida Mínima
CMM ₅₀	= Concentração Microbicida Mínima para 50%
CO ₂	= Dióxido de carbono
Cu	= Cobre
DMEM	= Meio Eagle Modificado por Dulbecco
DMSO	= Dimetil sulfóxido
DO	= Densidade óptica
EDTA	= Ácido etilenodiamino tetra-acético
ELISA	= Ensaio Imunossorvente Ligado à Enzima
Fe	= Ferro
IC ₅₀	= Capacidade Inibitória para 50%
IL-12	= Interleucina-12
IL-1 β	= Interleucina 1-beta
IL-6	= Interleucina-6
IL-8	= Interleucina-8
K	= Potássio
LPS	= Lipopolissacarídeo
Mg	= Magnésio
mg	= Miligrama

mg/mL	= Miligrama por mililitro
mL	= Mililitro
MMP	= Metaloproteinases da matriz
Mn	= Manganês
MOPS	= Ácido 3-(N-morfolino) propanosulfônico
MRSA	= <i>Staphylococcus aureus</i> metilicina resistente
MTT	= Brometo de 3(4,5-dimetiltiazol-2-yl)2,5-difeniltetrazólio
Na	= Sódio
NaCl	= Cloreto de sódio
NCCLS	= <i>National Committee for Clinical Laboratory Standards</i>
nm	= Nanômetro
NO	= Óxido Nítrico
OMS	= Organização Mundial da Saúde
P	= Fósforo
PBS	= Solução fisiológica tampão fosfato
pg/mL	= picograma por mililitro
pH	= potencial hidrogeniônico
PHA	= Fitohemaglutinina
rpm	= Rotações por minuto
RPMI	= Meio desenvolvido por Moore et al. em Roswell Park Memorial Institute
SFB	= Soro Fetal Bovino
Si	= Silício
Sr	= Estrôncio
Ti	= Titânio
TNF- α	= Fator de Necrose Tumoral alfa
TSB	= Caldo Soja Trypticase
Zn	= Zinco
°C	= Graus Celsius
μ g/mL	= Microgramas por mililitro
μ L	= Microlitro

Oliveira JR. Ensaio de citotoxicidade de extratos naturais após determinação da concentração microbicida mínima para *Staphylococcus* spp., *Streptococcus mutans* e *Candida* spp. [dissertação]. São José dos Campos: Faculdade de Odontologia de São José dos Campos, UNESP - Univ Estadual Paulista; 2011.

RESUMO

A proposta deste estudo foi avaliar a atividade antimicrobiana e citotoxicidade dos extratos vegetais de *Equisetum arvense* L. (cavalinha), *Glycyrrhiza glabra* L. (alcaçuz), *Punica granatum* L. (romã) e *Stryphnodendron barbatimam* Mart. (barbatimão). A atividade antimicrobiana dos extratos vegetais foi analisada em cepas de *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Streptococcus mutans*, *Candida albicans*, *Candida glabrata* e *Candida tropicalis*, sendo uma ATCC e nove clínicas, através do teste de microdiluição em caldo, contudo para se determinar a Concentração Microbicida Mínima (CMM) dos extratos foram feitas sementeiras do conteúdo dos poços das placas de microdiluição. A citotoxicidade das CMM dos extratos naturais foi verificada pelo método colorimétrico MTT e pela quantificação da produção de citocinas IL-1 β e TNF- α pelo teste ELISA, para tanto, foram utilizadas culturas celulares de macrófagos de camundongos (RAW 264.7). Os resultados foram analisados estatisticamente pelo teste ANOVA complementado por Tukey, com significância de 5%. Para o extrato de cavalinha, romã e barbatimão foi determinada como CMM efetiva para todas as cepas a concentração de 50 mg/mL e para o extrato de alcaçuz 100 mg/mL. Quanto à citotoxicidade destas concentrações, pelo método MTT, foi observada redução significativa da viabilidade celular ($p \leq 0,05$), em relação ao grupo controle, para 48% no grupo tratado com cavalinha, 79% para alcaçuz, 76% para romã e 86% para barbatimão. Em relação à quantificação de IL-1 β , os grupos tratados com extratos de alcaçuz e cavalinha exibiram semelhanças ao grupo controle ($p \geq 0,05$) com produção de 1,99 e 1,32 pg/mL respectivamente, contudo o grupo tratado com extrato de barbatimão produziu 3,98 pg/mL ($p < 0,05$) e o grupo que recebeu tratamento com extrato de romã a produção foi de 7,72 pg/mL ($p < 0,01$), diferindo significativamente do grupo controle (2,20 pg/mL). Quanto à produção de TNF- α , o nível basal foi de 41,96 pg/mL, entretanto, nos grupos tratados com os extratos foi observada redução significativa ($p < 0,01$) e semelhança estatística entre eles ($p > 0,05$), sendo 4,92 pg/mL para o grupo tratado com alcaçuz, 0,85 pg/mL para barbatimão e 0,83 pg/mL para cavalinha, contudo, o grupo que recebeu

tratamento com romã não foi constatada produção de TNF- α . De acordo com os resultados obtidos, concluiu-se que todos os extratos testados apresentaram atividade antimicrobiana contra todas as cepas avaliadas e de acordo com os parâmetros de citotoxicidade utilizados o extrato de alcaçuz foi o menos citotóxico.

Palavras-chave: *Equisetum arvense*. *Glycyrrhiza*. *Granatum*. *Stryphnodendron barbatimam*. Produtos com ação antimicrobiana. Citotoxicidade. Citocinas.

Oliveira JR. Cytotoxicity of natural extracts after determination of Minimum Microbicide Concentration for *Staphylococcus* spp., *Streptococcus mutans* and *Candida* spp. [dissertation]. São José dos Campos: School of Dentistry of São José dos Campos, UNESP – Univ Estadual Paulista; 2011.

ABSTRACT

The objective of this study was to verify the antimicrobial activity and cytotoxicity of *Equisetum arvense* L. (horsetail), *Glycyrrhiza glabra* L. (licorice), *Punica granatum* L. (pomegranate) and *Stryphnodendron barbatimam* Mart. (barbatimam) glycolic extracts. The antimicrobial activity of the extracts was analyzed in *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Streptococcus mutans*, *Candida albicans*, *Candida glabrata* and *Candida tropicalis* strains, being one ATCC and nine clinics through the method of microdilution in broth according to NCCLS. It was realized sowing of the contents from the well of microdilution plate, after incubation, for determination of MMC of the natural extracts. The cytotoxicity of the extracts was evaluated for MTT assay, having as an experimental model cultivation of mice macrophages (RAW 264.7), and through the ELISA test, for cytokine quantification IL-1 β and TNF- α produced by the cellular cultivation after a period of 24 hours exposed to the extracts MMC. The results were subordinated to statistical analysis (ANOVA and Turkey test), with $p \leq 0,05$. Related to the antimicrobial activity, the natural extracts of horsetail, pomegranate and barbatimam eliminated all the strains to the concentration of 50 mg/mL and the natural extract of licorice promoted the elimination of 100 mg/mL. Regarding to the cellular viability of the active MMC for the 100% of strains, it was observed meaningful reduction ($p < 0,01$) in all the natural extracts compared to the control group, and, as a result, horsetail exhibited an average of 48%; licorice, 79%; pomegranate, 76%; e barbatimam, 86%. As the production of cytokine the pomegranate extract presented production of IL-1 β (7,72 pg/mL) significantly superior to the other groups, including the control ($p < 0,05$). The barbatimam extract exhibited an intermediate average value of IL-1 β (3,98 pg/mL), being statistically different of the other groups ($p < 0,01$). The extracts of licorice and horsetail, presented values of IL-1 β similar to the control ($p > 0,05$). In relation to the production of TNF- α , all the extracts showed a significantly less production than the control (41,96 pg/mL) ($p < 0,05$), being similar among themselves ($p > 0,05$). The pomegranate extract presented total inhibition of the TNF- α production, followed by the

horsetail extract (0,83 pg/mL), barbatimam (0,85 pg/mL) and the licorice (4,92 pg/mL). In conclusion, all the extracts showed antimicrobial activity for the evaluated microorganisms. Even though, according to the analysed cytotoxicity parameters, the extract of licorice was less cytotoxic.

Keywords: Equisetum arvense. Glycyrrhiza. Granatum. Stryphnodendron barbatimam. Products with Antimicrobial Action. Cytotoxicity. Cytokines Citokine.

1 INTRODUÇÃO

Produtos naturais são estudados e utilizados há anos pela humanidade como forma alternativa de tratamento de enfermidades, datando de milênios de anos, quando, por muito tempo, era apenas esta prática que os povos antigos utilizavam para curar seus doentes. Tal costume veio através dos tempos, passando de geração em geração, aos dias atuais (Calixto, 2000; Calixto, 2005).

Sabia-se que as plantas curavam, mas não se conhecia como ou o que era capaz de trazer de volta a saúde do paciente. No século XVI, o médico suíço Philippus von Hohenheim (1493 - 1541) lançou uma teoria dizendo que as características de uma planta como forma, cor, sabor e odor, relacionavam-se com suas propriedades terapêuticas, o que permitiria seu uso clínico. Esta teoria ficou conhecida como a teoria “semelhante cura semelhante” e apenas no século XIX iniciou-se a descoberta destes compostos terapêuticos. Neste mesmo século também ocorreu o desenvolvimento da Química Orgânica e o uso de substâncias quimicamente sintetizadas. Posteriormente, no século XX, os avanços tecnológicos permitiram que pesquisadores isolassem os princípios ativos das plantas e a partir deste ponto desenvolvessem novos fármacos (Turolla, 2004).

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

Tanto extratos como óleos essenciais apresentam comprovados resultados de ação contra diversas enfermidades. Estudos *in vitro* e *in vivo* tem demonstrado que os componentes químicos de plantas medicinais apresentam muitas atividades, dentre as quais se destacam: atividade antibacteriana contra bactérias Gram-positivas e Gram-negativas, antifúngica, antiviral, contra protozoários e helmintos, anti-inflamatória, antisséptica, antitumoral, antioxidativa, antialérgica, antipirética, anticonvulsiva, antidepressiva, anticonceptiva, analgésica e diurética (Navarro et al., 1996; Maza et al., 2003; Holetz et al., 2005; Meléndez, Capriles, 2006; Haidari et al., 2009). Alguns compostos podem servir para o tratamento de diabetes, doenças do sistema nervoso, como o mal de Alzheimer, doenças odontológicas, infertilidade masculina e disfunção erétil, dentre inúmeras outras capacidades de terapia que os componentes das plantas podem apresentar (Jurenka, 2008).

Estudos realizados com *Equisetum arvense* L., conhecida popularmente no Brasil como cavalinha, tem demonstrado forte ação antimicrobiana contra uma série de microrganismos, incluindo bactérias Gram-positivas e Gram-negativas, leveduras e fungos filamentosos (Radulovic et al., 2006). Segundo Joksic (2003), a cavalinha também pode ser utilizada em infecções do trato urinário. No entanto, não são observados estudos que avaliem sua citotoxicidade.

A atividade antimicrobiana de *Glycyrrhiza glabra* L. (alcaçuz) tem sido demonstrada na literatura, como no estudo de Wittschier et al. (2009), que constataram atividade antibacteriana contra *Helicobacter pylori* e *Porphyromonas gingivalis*. Pellati et al. (2009) observaram efetividade de um composto extraído deste vegetal, o ácido glicirretínico, contra *Candida albicans*, sendo importante ampliar os estudos nesta área.

Substâncias antimicrobianas de *Punica granatum* (romã) tem sido estudadas com intensidade, atualmente se sabe que são os taninos que apresentam maior capacidade de ação contra

microrganismos (Haslam, 1996; Vasconcelos et al., 2006). Além dos taninos, polifenóis também apresentam ação antimicrobiana, de modo que este extrato pode ser promissor para utilização contra microrganismos em diferentes áreas da saúde, incluindo a odontológica. Assim, torna-se também relevante analisar seu potencial citotóxico.

Extrato de *Stryphnodendron barbatiman* Mart. (barbatimão) tem efeito antibacteriano, antifúngico, além de ter demonstrado ação antiviral, como constatado por Felipe et al. (2006), quando verificaram inibição de duas linhagens de herpesvírus bovinos pelo extrato de barbatimão. Souza et al. (2007), constataram o potencial bactericida do barbatimão em cepas de *S. aureus* e *S. epidermidis*. Ishida et al. (2006), observaram a efetividade deste extrato em *C. albicans*.

Apesar da ampla atividade antimicrobiana de extratos vegetais, o fator toxicidade também deve ser levado em consideração. Estudos atuais demonstram que pode ocorrer baixa citotoxicidade de um fitoterápico, como também elevada citotoxicidade com eliminação total ou parcial de células cultivadas (acima de 50%). Entretanto, se a citotoxicidade for seletiva em células tumorais, por exemplo, tem-se nas mãos a oportunidade da utilização da fitoterapia para tratamento de neoplasias (Yan et al., 2009; Oliveira et al., 2009; Guerrero et al, 2011).

Sabendo-se da importância da utilização de extratos naturais na área médica, no tratamento de diversas enfermidades, torna-se importante verificar a atividade antimicrobiana de extratos de plantas medicinais utilizadas popular e tradicionalmente no Brasil sobre diferentes microrganismos. Torna-se também interessante avaliar seus efeitos citotóxicos, a fim de selecionar fitoterápicos que apresentem maior espectro de ação antimicrobiana e menor citotoxicidade, para que possam ter aplicações clínicas, especialmente na área odontológica, como por exemplo, em enxaguatórios bucais e irrigantes de canais radiculares.

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 Grupos de microrganismos alvos da pesquisa

2.1.1 *Staphylococcus aureus*

Trata-se de cocos Gram-positivos, rearranjados sob a forma de cachos irregulares ou em células isoladas aos pares, sendo anaeróbios facultativos. As colônias de *S. aureus* apresentam pigmentação amarelada, devido à presença de grande quantidade de carotenóides na membrana celular do microrganismo, por isso receberam tal denominação, uma vez que, *aureus* significa dourado em latim (Tortora et al., 2005; Jorge, 2006).

Esta bactéria faz parte da microbiota normal do corpo humano, tendo por nicho ecológico a mucosa nasal, contudo é uma das bactérias patogênicas mais importantes por produzir infecções que variam de localizadas à sistêmicas, sendo classificadas como superficiais ou mistas (Tenover, Gorwitz, 2006; Trabulsi, Alterthum, 2008)

S. aureus produzem diversos fatores de virulência. No Quadro 01, podem ser observados os principais destes fatores, bem como estruturas e substâncias bacterianas envolvidas, além da maneira como afetam o hospedeiro (Trabulsi, Alterthum, 2008). A capacidade de aderência em superfícies de biomateriais e formação de camadas bacterianas (biofilme) também é um fator importante apresentado por esta espécie (Novick, 2003).

Quadro 01 - Principais fatores de virulência de *S. aureus**

Fator de virulência	Estrutura e Substância	Finalidade
Componentes da superfície celular	a) Cápsula polissacarídica	- Proteger a bactéria da fagocitose.
	b) Peptidoglicano e ácidos teicóicos	- Estimular a produção de citocinas.
	c) Proteína A	- Bloquear a ação de anticorpos (evasão da fagocitose). - Funcionar como adesina em infecções intravasculares.
	d) Proteínas ligadoras à fibronectina, ao colágeno e ao fibrinogênio	- Promover a adesão e colonização do microrganismo nos tecidos.
Toxinas	a) α -toxina	- Capacidade de formar poros na membrana celular de leucócitos (evasão da fagocitose). - Acarretar choque séptico, pela liberação de citocinas após a lesão na membrana celular.
	b) Leucocidina	- Capacidade de destruir leucócitos.
	c) Superantígeno	- Produzir Síndrome do Choque Tóxico (TSST).
	d) Enterotoxina estafilocócica	- Causar intoxicação alimentar estafilocócica.
	e) Esfoliativa	- Degradar moléculas de adesão do epitélio cutâneo.
Enzimas	a) Coagulase b) Catalase c) Desoxirribonuclease d) Hialuronidase e) Lipase f) Protease g) Estafiloquinase	- Degradar substâncias para fins nutricionais e de disseminação pelos tecidos.

*(Trabulsi, Alterthum, 2008)

As infecções por *S. aureus* podem acometer a pele e tecidos moles, causando nestes, impetigo bolhoso, abscessos, furunculoses e síndrome da pele escaldada, podendo ainda ter acometimento sistêmico, acarretando em infecção da circulação sanguínea, endocardite e pneumonia, além de sintomas relacionados com toxinas, como síndrome do choque tóxico e intoxicação alimentar (Tenover, Gorwitz, 2006; Durupt et al., 2007).

Segundo Smith et al. (2001), *S. aureus* podem produzir infecções bucais, dentre as quais, destacam-se infecções endodônticas, infecções da glândula parótida, osteomielite mandibular e mucosite. Dentre as espécies de estafilococos presentes na cavidade bucal de 24 a 36% são *S. aureus* pertencentes à microbiota transitória.

O surgimento de cepas de *S. aureus* resistentes a antimicrobianos é consequência do uso inapropriado de antibióticos (Jorge, 2006), fator que contribui para dificuldade no tratamento de infecções estafilocócicas (Smith, Jarvis, 1999). A resistência demonstrada por tais cepas está relacionada com a presença de plasmídeos que transferem estas informações genéticas aos clones bacterianos (Smith, Jarvis, 1999).

Diversas classes de *S. aureus* resistentes a antimicrobianos tem surgido com o passar dos tempos, como os resistentes à penicilina G, por volta de 1940, os multirresistentes, à penicilina G, ao cloranfenicol, à tetraciclina e à eritromicina, na década de 1950, e os *Methicillin-resistant Staphylococcus aureus* (MRSA), nos anos 60, sendo este último considerado a maior causa de infecções hospitalares (Vandenesch et al., 2003; Zetola et al., 2005; Deurenberg, 2008).

Segundo Yamamoto et al. (2009), MRSA tem a capacidade de persistirem em hospitais e na população em geral, podendo estas cepas serem adquiridas nestes dois sítios. Os autores destacaram ainda que, atualmente diversos clones desta bactéria tem

sido identificados e suas características epidemiológicas, clínicas e genéticas descritas. Afirmaram, ainda, que a sobrevivência de cepas adquiridas na comunidade estão ligadas à capacidade genética, de colonização e infecção, de produção de toxinas e resistência a fármacos adquiridas do microrganismo progenitor. Estes autores relataram também que há ocorrência de infecções por MRSA, adquiridos fora dos hospitais, em crianças e jovens saudáveis, portadores de diabetes e pacientes idosos.

2.1.2 *Staphylococcus epidermidis*

S. epidermidis são bactérias Gram-positivas, com maior predominância na pele e nas mucosas de indivíduos saudáveis, sendo este predomínio relacionado com a capacidade de produzirem bacteriocinas ativas contra outras bactérias Gram-positivas. São considerados importantes agentes de infecção hospitalar, uma vez que, tem a facilidade de formação de biofilmes em superfícies de polímeros, como cateteres e sondas, sendo que nestes biofilmes encontra-se apenas a espécie em questão, por conta da produção de bacteriocinas (Trabulsi, Alterthum, 2008).

Segundo Vuong (2002), infecções por *S. epidermidis* estão associadas à implantação de próteses cardíacas, articulares e vasculares e cateteres intravenosos e peritoniais. Trabulsi e Alterthum (2008) afirmaram que o sucesso deste patógeno está condicionado à capacidade de aderência nas superfícies de polímeros, formando biofilmes.

Em comparação com *S. aureus*, *S. epidermidis* apresentam menos fatores de virulência, como podem ser observados no Quadro 02.

Quadro 02 - Principais fatores de virulência de *S. epidermidis**

Fator de Virulência	Finalidade
a) Hemolisina (δ -toxina)	- Formar poros na membrana de eritrócitos e outras células do hospedeiro. - Participar na formação de biofilme.
b) Enzimas extracelulares	- Lisar proteínas e componentes do sistema imune do hospedeiro. - Inativar a dermacidina, um peptídeo antimicrobiano presente na pele. - Lisar lipídeos. - Esterificar ácidos graxos a colesterol para inibição da atividade antimicrobiana desta substância.
c) Biofilme	- Dificultar a penetração e difusão de antimicrobianos e componentes de defesa do sistema imune.

*(Trabulsi, Alterthum, 2008)

Segundo Stewart e Costerton (2001) a formação de biofilme, além de oferecer a estes microrganismos proteção contra os agentes antimicrobianos, contribui para a alteração de seu metabolismo, garantindo-lhes sobrevivência em ambientes hostis.

Os microrganismos organizados em biofilme apresentam maior resistência tanto a agentes antimicrobianos como a componentes da imunidade do hospedeiro de dez a mil vezes mais, se comparados com células de culturas planctônicas (Davey, O'Toole, 2000; Zanin et al., 2006).

2.1.3 *Streptococcus mutans*

S. mutans são cocos Gram-positivos dispostos em cadeia ou aos pares, são anaeróbios facultativos ou estritos, tendo crescimento estimulado pela presença de CO₂ (Jorge, 2006).

São considerados como a mais importante bactéria responsável pela formação de cárie. Minutos após a escovação forma-se uma película de proteínas salivares na superfície dentária. Nesta película, horas depois, bactérias cariogênicas se estabelecerão produzindo um polissacarídeo, denominado dextrana, e o acúmulo de bactérias e dextrana nos dentes forma o biofilme dentário. Como o biofilme é pouco permeável à saliva, não ocorre diluição ou neutralização do ácido láctico produzido pelas bactérias neste biofilme, resultando em desmineralização do esmalte dos dentes e aderência destes microrganismos nestes sítios recém expostos, promovendo a progressão da lesão cariosa em direção à polpa (Tortora et al., 2005).

A presença de *S. mutans* na cavidade bucal pode variar, uma vez que, fatores como, fluxo salivar, capacidade tampão da saliva e presença de imunoglobulinas salivares, interferem na colonização destes microrganismos (Barbieri et al., 2007).

S. mutans utilizam-se de enzimas secretadas por eles mesmos, como as glicosiltransferases atuantes na formação de polissacarídeos extracelulares da sacarose, para aderirem-se à superfície dos dentes no biofilme (Ooshima et al., 2000).

2.1.4 Leveduras do gênero *Candida*

Este gênero apresenta mais de duzentas espécies, sendo *C. albicans*, *C. tropicalis* e *C. glabrata* as de maior relevância médica, por serem isoladas em mais de 80% em candidoses (Jorge, 2006).

C. albicans é aeróbia facultativa, podendo crescer sob condições de anaerobiose. São microrganismos dimórficos, podendo apresentarem-se na forma de leveduras e de pseudo-hifas. Estas leveduras fazem parte da microbiota natural do corpo humano, estão presentes na pele, na mucosa oral e no trato geniturinário, vivendo comensalmente. São isoladas com maior frequência de amostras clínicas humanas, sendo consideradas como a mais patogênica para os seres humanos, podendo colonizar mucosa oral, superfície da língua e palato. Em pacientes imunodeprimidos, estas leveduras podem gerar infecções oportunistas, como candidoses vaginais, bucais ou sistêmicas e até fatais (Arendorf, Walker, 1980; Chandra et al., 2001; Burton, Engelkirk, 2004)

C. glabrata é a segunda espécie mais isolada da cavidade bucal, principalmente por portadores de prótese total. Já foram descritos casos de endocardite e fungemia pela espécie. *C. tropicalis* pode apresentar quadros de candidose invasiva e hospitalar, sendo bem semelhantes às causadas por *C. albicans*. Esta espécie de levedura pode demonstrar uma variabilidade fenotípica acentuada. São comumente isoladas da cavidade nasal, garganta, pele, vagina e trato gastrointestinal de indivíduos saudáveis (Jorge, 2006).

Discute-se na comunidade científica os fatores que permitem *Candida* spp. a serem patogênicas, dentre estas capacidades, destacam-se: a) aderência na mucosa; b) formação de pseudo-hifas, na proposição de oferecer maior resistência à fagocitose; c) secreção de toxinas; d) liberação de enzimas histolíticas, para penetração no tecido do

hospedeiro; e) neutralização de componentes do sistema imune (Jorge, 2006).

Dignani et al. (2003) afirmaram que estes microrganismos passam de comensais a patogênicos, quando ocorrem alterações nos mecanismos imunológicos do hospedeiros e perda de barreiras anatômicas provenientes de queimaduras ou procedimentos médicos traumáticos. As infecções por *Candida* spp. podem variar de doenças superficiais à invasivas, acometendo pele e mucosas, inclusive de pessoas saudáveis, com pequenas alterações locais devido a resposta imune do hospedeiro, no entanto, infecções sistêmicas pela levedura podem afetar órgãos vitais, disseminadas por via hematogênica (candidemia). Complicações geradas pela infecção fúngica, geralmente, estão presentes em pacientes portadores de doenças degenerativas e neoplásicas.

2.2 Fitoterápicos

Fitoterápicos são medicamentos de origem vegetal, podendo ser da planta fresca, composto químico vegetal ou seus derivados, tais como, extrato, tintura, óleo, entre outros, como suco e cera, sendo obtidos através de técnicas adequadas. São utilizados para fins profiláticos, curativos, paliativos ou de diagnóstico. Estes medicamentos são caracterizados pelo conhecimento de sua eficácia e riscos quanto ao seu uso, bem como sua reprodutibilidade e constância de sua qualidade (ANVISA, 2004).

Os fitoterápicos tradicionais são os medicamentos sintetizados a partir de plantas medicinais utilizadas tradicionalmente por uma população, com ausência de riscos à saúde, comprovada por estudos toxicológicos, e demonstração de eficácia por meio de

levantamentos etnofarmacológicos ou com dados obtidos junto a documentações tecnocientíficas e publicações indexadas (ANVISA, 20004).

Segundo a ANVISA (2004), os medicamentos fitoterápicos novos devem ter a comprovação científica de sua eficácia terapêutica, segurança e qualidade. O relatório científico para o registro de novos fitoterápicos compreende diversas etapas, destacando-se:

- a) Relatório de Produção: descrição da fórmula farmacêutica completa; nomenclatura botânica oficial completa; quantidade de substâncias; descrição das etapas de produção; tamanho mínimo e máximo dos lotes; metodologia de controle; descrição dos critérios de identificação do lote industrial;
- b) Relatório de Qualidade: sobre droga vegetal devem-se constar os métodos de secagem; estabilização; conservações utilizadas; laudo de identificação por profissional habilitado; descrição detalhada da metodologia utilizada no controle de qualidade, quando esta não estiver inserida na Farmacopéia reconhecida pela ANVISA. Sobre derivados de droga vegetal, deve-se informar nomenclatura botânica oficial, nomenclatura farmacopeica e/ou tradicional; parte da planta utilizada; substâncias utilizadas na extração do derivado; testes de autenticidade; testes de pureza e integridade; análise qualitativa e quantitativa dos princípios ativos e/ou marcadores.

O princípio ativo dos fitoterápicos são substâncias quimicamente identificadas, conhecidas como flavonóides, ácidos graxos, alcalóides, entre outros, que apresentam ação farmacológica demonstrada pelos efeitos terapêuticos destes medicamentos (ANVISA, 2004).

Miguel (2007) afirmou que os medicamentos fitoterápicos geralmente são utilizados de forma profilática ou então complementando outras terapias, contudo, a ação terapêutica destes medicamentos pode não ser imediata. O uso destes medicamentos é reconhecido pela Organização Mundial da Saúde (OMS), porém recomenda que sejam realizados estudos científicos que comprovem sua eficácia.

2.3 Plantas medicinais

Plantas medicinais são aquelas que em sua composição estão presentes princípios ativos capazes de oferecer suporte terapêutico e servem de base para medicamentos fitoterápicos (Miguel, 2007).

Desde tempos remotos os vegetais tem sido utilizados para tratamento de enfermidades (Calixto, 2000; Calixto, 2005; Harvey, 2000; Rousseaux, Schachter, 2003) e segundo Ko (1999) e Tyler (1996) esta prática pode ter sido utilizada ativamente no período de 3000 a.C. Há cerca de 5.000 anos já era feita a prescrição de produtos naturais para fins de tratamento (Turolla, 2004). Em 78 d.C., o botânico grego Pedanios Dioscorides apresentou em sua obra “De Materia Medica”, 600 espécies de plantas medicinais, que foi referência na área farmacológica por mais de catorze séculos (Robbers et al., 1996; Tyler, 1996). Hostettmann et al. (2003) afirmaram que as plantas medicinais foram por muitos anos a única forma de cura para as doenças que acometiam os seres humanos.

Somente a partir de meados do século XIX, com o advento da química orgânica e surgimento de técnicas de isolamento de substâncias ativas presentes nos vegetais, deu-se início a síntese industrial de fármacos, que acarretou na substituição de medicamentos naturais pelo uso de sintéticos. Mesmo assim, as plantas medicinais continuaram sendo uma forma alternativa de tratamento em todo o planeta, pois pesquisas eram realizadas para se constatar a eficácia de tais substâncias, bem como, possíveis riscos à saúde, pelo fato de algumas plantas apresentarem componentes desencadeadores de reações adversas, seja pela sua própria composição química ou por aquisição externa nos processos de elaboração, que passa pelo cultivo, coleta da planta, extração das substâncias ativas e a síntese final do fitoterápico (Turolla, 2004).

Rates (2001) alegou que a produção de fármacos através de síntese química cresceu pela própria elevação da economia que envolvia a indústria farmacêutica naquela época, mas, por outro lado, havia falta de comprovações científicas da eficácia das substâncias oriundas das plantas medicinais e dificuldades relacionadas ao controle químico, físico-químico, farmacológico e toxicológico dos extratos utilizados.

Na década de 60 foi observado desinteresse da indústria farmacêutica na produção de fitoterápicos e dos centros de pesquisas no desenvolvimento de novos compostos, uma vez que se acreditava que as principais substâncias ativas de plantas já haviam sido isoladas e modificadas quimicamente. Vinte anos mais tarde, ressurgiu-se o interesse por pesquisas destas substâncias, pelo fato do avanço tecnológico ter proporcionado o isolamento e identificação de novas substâncias, até mais complexas, em um período mais breve de tempo, produzindo-se desta forma novos fármacos. Atualmente os fitoterápicos são utilizados em escala mundial, sendo considerados uma excelente alternativa de terapia em países subdesenvolvidos, como os do

continente africano, onde fármacos apresentam preços altos (Schenckel et al., 2001; Turolla, 2004). Segundo Aschwanden (2001) cerca de 80 % da população é dependente deste tipo de medicamento.

Ramos et al. (2008) afirmaram que cerca de 25 a 30% de todos os medicamentos disponíveis atualmente são derivados de fontes naturais como plantas, microrganismos e animais. Segundo Miguel (2007), somente no ano de 1998, dentre os vinte medicamentos mais consumidos, cerca de dez eram provenientes de produtos naturais e entre os fármacos anticancerígenos e antibióticos o percentual chegou a 70% desenvolvidos a partir de plantas e toxinas animais.

Dentre 250 mil espécies de plantas superiores, um pouco mais de 100 mil, apresentaram princípio ativo com capacidade de tratamento de moléstias. Assim, as plantas medicinais são de grande importância para a medicina moderna por: a) oferecer fármacos que seriam dificilmente elaborados via síntese química; b) oferecer compostos que podem sofrer leves modificações, que os tornam mais eficazes ou menos tóxicos; e, c) poder servir de protótipo para fármacos com atividades terapêuticas semelhantes (Robbers et al., 1996; Pinto et al., 2002).

2.4 Atividade antimicrobiana de plantas medicinais

Muitas plantas oriundas dos diversos biomas nacionais – Floresta Amazônica, Mata Atlântica, e cerrado – tem sido usadas como medicamentos naturais para tratamento de doenças tropicais, como leishmaniose, tripanossomíase e malária, além de infecções bacterianas e fúngicas (Mendes et al., 1999; Alves et al., 2000; Bedoya et al., 2002; Holetz et al., 2005; Luize et al., 2005).

Segundo Duarte (2006) apesar da imensa variedade de espécies de plantas nativas e exóticas do Brasil, há informações científicas de apenas 44 espécies de 20 famílias de vegetais com atividade antimicrobiana. A quantidade pequena de dados deve-se a um fator que dificulta a difusão dos resultados das pesquisas pela comunidade científica que é a apresentação de trabalhos unicamente em eventos científicos locais e regionais.

2.4.1 *Equisetum arvense* L. (Cavalinha)

Conhecido popularmente no Brasil como cavalinha, *E. arvense* L., membro da família Equisetaceae, é rico em vitaminas C, E, K, B1, B2, B6, ácido nicotínico, ácido fólico e ácido pantotênico, além de, Na, K, Ca, Mg, P, Fe, Zn, Cu, Mn, Si, Sr, Ti (Nagai et al., 2005).

Segundo Radulovic et al. (2006), *E. areense* L. tem ampla distribuição pelo hemisfério norte, sendo utilizado como medicamento em diversos países do mundo. Joly (1979) relatou que esta planta é encontrada em diversas regiões da Europa e foi introduzida nas Américas do Norte, Central e do Sul.

O óleo essencial de *E. areense* L. apresenta forte atividade antimicrobiana, devido à substâncias como timol e linalol, contra *S. aureus* e bactérias Gram-negativas, como *Salmonella enteritidis*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Klebsiella pneumoniae*, além do fungo filamentoso *Aspergillus niger* e da levedura *C. albicans* (Radulovic et al., 2006).

A cavalinha apresenta efeitos de diurese (Graefe; Viet, 1999), podendo ser utilizada no tratamento de infecções do trato urinário e de osteoporose (Joksic, 2003), apresenta atividade antioxidante (Trouillas et al., 2003; Milovanovic et al., 2007), é

vasodilatador (Sakurai et al., 2003), anticonceptivo (Martins et al., 2004), anti-inflamatório (Hoffman, 1990; Ody, Kindersley, 1993; Martins et al., 2004), antimicrobiano de forte ação (Radulovic, 2006; Milovanovic et al., 2007), analgésico (Monte et al., 2004) e antiproliferativo (Cetojevic-Simin et al., 2010).

2.4.2 *Glycyrrhiza glabra* L. (Alcaçuz)

G. glabra L., conhecida no Brasil como alcaçuz, faz parte da família das leguminosas (Fabaceae), sendo a raiz a parte utilizada e reconhecida com atividades terapêuticas, podendo ser utilizada como antiácido, no tratamento de úlceras (Hikino, 1985; Wittschier et al., 2009), como anti-inflamatório, expectorante, diurético (Shibata, 2000), antialérgico (Kanazawa et al., 2003; Shin et al., 2007), antiasmático (Kakegawa et al., 1992), antipirético (Lata et al., 1999), ansiolítico (Ambawade et al., 2001), anticonvulsivo (Ambawade et al., 2002), intensificador de memória (Dhingra et al., 2004), antidepressivo (Bryant, Brown, 1986; Kanazawa, 1994; Dhingra, Sharma, 2006), antiviral (Sasaki et al., 2002) e antimicrobiano (Fukai et al., 2002). O extrato de alcaçuz também pode ser usado no tratamento de hemorróidas e melanoma (Fukai et al., 2002).

Embora cresça em diversas regiões do mundo, *G. glabra* L. é nativa da região Mediterrânea (Gupta et al., 2008; Asl, Hosseinzadeh, 2008), sendo que esta espécie vegetal tem preferências por clima temperado (Mitscher et al., 1980).

Segundo Takino et al. (1979) e Okada et al. (1981), o principal composto do alcaçuz é a glicirrizina, cinquenta vezes mais doce que a sacarose. Bradley (1992) destacou que além da glicirrizina há também dois outros importantes constituintes, os sais de potássio e cálcio

do ácido glicirrízico. Em seu estudo, Hikino (1985) afirmou que os menores constituintes da *G. glabra* incluíram triterpenóides, glabranina A e B, gliciretol, glabrolida. Bradley (1992) e Bisset (1994) encontraram, entre outras moléculas, isoflavonas, formononetina, glabrona e neoliquiritina.

A atividade antimicrobiana apresentada pelo alcaçuz se deve justamente pela presença de substâncias como saponinas, flavonóides, isoflavonas e cumarinas, sendo a isoflavona glabridina descrita como a substância de maior atividade antimicrobiana (Asl, Hosseinzadeh, 2008). Fukai et al. (2002) demonstraram que a glabridina e glabreno, outra isoflavona de *G. glabra* L., apresentaram atividade antimicrobiana contra cepas de *S. aureus*, sendo a primeira mais eficaz.

Segundo Motsei et al. (2003), o extrato aquoso do rizoma do alcaçuz apresentou efetividade contra *C. albicans*, e pode ter utilidade caseira contra candidose pela sua facilidade no preparo, em comparação com extratos preparados com solventes orgânicos, embora também apresentem boa atividade antifúngica.

Wittschier et al. (2009) observaram que o extrato de alcaçuz apresentou efeitos inibitórios de adesão de *Helicobacter pylori* no epitélio gástrico humano ou nas camadas superficiais da mucosa. Segundo Warren e Marshall (1983), *H. pylori* é responsável, pelo desenvolvimento de gastrites crônicas, carcinoma gástrico e linfoma gástrico.

O extrato de *G. glabra* L. também demonstrou inibição da aderência de *Porphyromonas gingivalis* (Wittschier et al., 2009), uma bactéria causadora, por exemplo, de doenças periodontais destrutivas. *P. gingivalis* se adere fortemente em células epiteliais, hemácias, colágeno e outras bactérias por uma série de enzimas, que constitui um de seus fatores de patogenicidade (Sandros et al., 1993).

Em 2009, Pellati et al. demonstraram que o ácido glicirretínico, extraído do alcaçuz, teve atividade antifúngica contra cepas

de *C. albicans* isoladas de pacientes com candidose vulvovaginal, podendo ser utilizado como método alternativo de tratamento tópico.

2.4.3 *Punica granatum* L. (Romã)

P. granatum L., conhecida no Brasil como romã pertence à família Punicaceae. As pequenas árvores ou arbusto produtores de romã são de origem mediterrânea, (Negi, Jayprakash, 2003). Os principais componentes do extrato do fruto são taninos e polifenóis (Haslam, 1996; Vasconcelos et al., 2006). Machado et al. (2002) identificaram o tanino responsável pela atividade antimicrobiana, o elagitanino punicalagina. Vasconcelos et al. (2006) sugeriram que os taninos afetam a membrana de bactérias e leveduras.

Diversos estudos estão sendo realizados com *P. granatum* L., para avaliar a atividade antimicrobiana contra bactérias Gram-positivas e Gram-negativas (Navarro et al., 1996; Meléndez, Capriles, 2006). Braga et al. (2005) observaram que o extrato de romã não apenas inibiu o crescimento de *S. aureus*, mas também evitou a produção de enterotoxinas. Fenner et al. (2006) sugeriram que a casca e as flores do fruto apresentam potencial atividade antifúngica. Segundo Haidari et al. (2009), polifenóis purificados de *P. granatum* L. inibiram a replicação do Vírus Influenza A, demonstrando efeito sinérgico ao antiviral oseltamivir (Tamiflu®).

Das et al. (1999) descreveram a forte atividade antimicrobiana contra *Bacillus subtilis*, *Escherichia coli* e *Saccharomyces cerevisiae*, provavelmente pela presença do ácido puníico.

Os extratos etanólico, clorofórmico, metanólico e aquoso de *P. granatum* L., em *S. aureus*, *E. coli*, *Klebsiella pneumoniae*,

Proteus vulgaris, *B. subtilis* e *Salmonella typhi*, demonstraram eficiente atividade antimicrobiana, principalmente o extrato metanólico, em trabalho realizado por Prashanth et al. (2001). Negi e Jayaprakasha (2003) avaliaram a atividade antimicrobiana de extratos cetônico, metanólico e alcoólico da casca do fruto e verificaram que o extrato cetônico foi o que apresentou maior atividade antimicrobiana sob *Bacillus cereus*, *B. subtilis*, *B. coagulans*, *E. coli*, *P. aeruginosa* e *S. aureus*.

Pereira et al. (2006) verificaram a ação antimicrobiana de um gel derivado de *P. granatum* L., rico em taninos e polifenóis sob biofilme bacteriano. O gel demonstrou capacidade de inibição da aderência do microrganismo à superfície dentária. O estudo comprovou que tal substância ofereceu controle ao biofilme já formado.

P. granatum L., além de apresentar atividade antimicrobiana, possui ação antioxidante, anticarcinogênica e anti-inflamatória (Jurenka, 2008; Bialonska et al., 2009). Jurenka (2008) descreveu que diversos compostos da romã estão sendo aplicados no tratamento e prevenção de câncer, doenças cardiovasculares, doenças odontológicas, diabetes, disfunção erétil, infecções bacterianas e resistência a antibióticos. Ressalta ainda aplicações potenciais em isquemia cerebral infantil, infertilidade masculina, mal de Alzheimer, artrite e obesidade.

Gracious et al. (2001) relataram que extratos da raiz e do caule desta planta tem ação de adstringência e atividade anti-helmíntica. Segundo Chopra et al. (1992), a casca da romã pode ser utilizada no tratamento de diarreia e disenteria. Dell'Agli et al. (2009) também relataram o uso da casca da romã no tratamento da malária, por ter efeito antiplasmódico. Reddy et al. (2007) descreveram que o cozimento da raiz da planta é eficaz contra a febre e a debilidade causadas pela malária.

2.4.4 *Stryphnodendron barbatimam* Mart. (Barbatimão)

S. barbatimam Mart. faz parte da família Leguminosae, proveniente do cerrado brasileiro, conhecida neste país como barbatimão. *S. barbatimam* Mart. é sinônimo de *Stryphnodendron adstringens* Mart. (Mendonça et al., 1998).

Extratos da casca do caule desta planta são utilizados no tratamento de infecções vaginais e para adstringência de ferimentos (Alzugaray, Alzugaray, 1983; Santos, 1987). Segundo Lima et al. (1998) e Audi et al. (1999), estes extratos apresentam atividades anti-ulcerogênicas, anti-inflamatórias e antibacteriana e podem ser utilizados para tratar leucorréia, diarreia e infecções ginecológicas.

Felipe et al. (2006) demonstraram a inibição de duas linhagens de herpesvírus bovinos com utilização de extratos aquoso e alcoólico de barbatimão. Maza et al. (2003) e Holetz et al. (2005) demonstraram a ação do barbatimão contra os protozoários *Leishmania amazonensis*, *Trypanosoma cruzi* e *Herpetomonas samuelpessoai*.

Santos et al. (2009) verificaram que taninos do barbatimão possuem ação bactericida, antiviral e contra helmintos e protozoários. Segundo os autores, a atividade antimicrobiana dos taninos pode estar relacionada com a inibição da atividade enzimática, da fosforilação oxidativa e diminuição da disponibilidade de íons para o metabolismo microbiano.

Ishida et al. (2006) descreveram que o extrato de barbatimão apresentou a capacidade de inibir o crescimento de *C. albicans*, devido a: a) afetar a integridade da parede celular da levedura; b) diminuir a capacidade de aderência deste microrganismo; c) inibir a formação do tubo germinativo; d) interferir nos processos de brotamento; e, e) estimular a fagocitose por macrófagos. Em 2009, Ishida et al. relataram a ação de taninos, oriundos da casca do tronco de

barbatimão, que afetaram o crescimento, o tamanho da cápsula e a pigmentação do fungo *Cryptococcus neoformans*.

Segundo Santos et al. (2009) extratos aquoso e etanólico apresentaram atividade antimicrobiana contra *Streptococcus mutans*, *S. aureus*, *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* e *C. albicans*, sendo que o extrato etanólico apresentou melhor ação.

2.5 Citotoxicidade

O ensaio de citotoxicidade é um procedimento que visa avaliar a biocompatibilidade de um produto, isto é, o quanto este pode ser tóxico para uma determinada célula, contudo, podem ser utilizados diversos métodos para isso.

Segundo Freshney (1990) os ensaios de citotoxicidade podem apresentar resultados temporais imediatos ou em curto prazo, estando associados, em ambos os casos, com a permeabilidade da membrana celular ou dano específico ao metabolismo da célula, e tem por finalidade quantificar células viáveis expostas a condições traumáticas. As respostas de longo prazo dependerão da capacidade de renovação e sobrevivência da célula em estado alterado, que possa propiciar mutações genéticas, por exemplo, visando avaliar a capacidade metabólica ou proliferativa celular após ou durante contato com agentes tóxicos.

O método de contagem celular adicionado à exclusão pelo azul de Trypan pode ser utilizado para verificar a citotoxicidade de substâncias, uma vez que células não viáveis se coram pela passagem do azul de Trypan através da membrana celular que não esteja íntegra, como foi realizado por Koulaouzidou et al. (1999), que concluíram através deste método, que ao se empregar soluções irrigantes em diferentes

concentrações de EDTA neutro (15%, 1% e 0,1%), EDTA pH 7,4 (17%, 1% e 0,1%) e hipoclorito de sódio (2,25%, 1% e 0,1%), as soluções de 0,1% foram as que demonstraram citotoxicidade moderada. Contudo, o método de avaliação da toxicidade pelo uso do corante MTT demonstra além do número de células em uma amostra o nível de sua atividade metabólica (Mossan, 1983).

Mossman (1983) afirmou que o teste de citotoxicidade, pelo MTT, é um método confiável, que se reproduz fácil e rapidamente em laboratório, por meio da aplicação do corante brometo de 3(4,5-dimetiltiazol-2-yl)2,5-difeniltetrazólio, conhecido na literatura unicamente por MTT, um pó amarelo-fluorescente e solúvel em água, veiculado facilmente às células através de solução fisiológica. A reação ocorre em um sítio específico – nas mitocôndrias – de células viáveis, sob ação das enzimas desidrogenases mitocondriais que degradam o anel tetrazólio do MTT (Figura 01), produzindo cristais insolúveis de formazina.



Figura 01 - Redução do anel tetrazólio do MTT, pela enzima mitocondrial desidrogenase, em formazina.

Segundo Collier e Pritsos (2003), o MTT é metabolizado através de processos oxidativos e outras cadeias mitocondriais enzimáticas de elétrons, com isso, quanto maior a viabilidade celular, menor será a liberação de oxigênio reativo pelas células. O método de MTT tem sido frequentemente utilizado para analisar os efeitos citotóxicos

de diversos produtos, incluindo fitoterápicos (Schmalz et al., 2002; Kim et al., 2008; Yan et al., 2009; Yang et al., 2009; Yoon et al., 2009; Guerrero et al., 2011).

Outra forma de verificar a citotoxicidade de materiais e medicamentos é por meio da ativação celular e quantificação de citocinas.

Os macrófagos e diversas outras células do organismo, em resposta a um estímulo ativador, secretam pequenas proteínas, chamadas de citocinas. A ação destas citocinas tem início após a ligação a receptores específicos que provocam alteração na síntese do RNA e, conseqüentemente, de proteínas de diferentes células do organismo. Elas podem agir no local onde são sintetizadas no organismo ou ter ação distante, quando são secretadas e destinadas à circulação. Estes mediadores da resposta inflamatória podem ser interleucinas, como IL-1 β ; IL-6; IL-12, e fator de necrose tumoral (TNF- α), dentre outros, (Kraychete et al., 2006; Janeway et al., 2007).

As citocinas IL-1 β e TNF- α estão presentes, por exemplo, na regulação da reabsorção óssea, como ocorre na região periapical (Stashenko et al., 1998; Lee et al., 2007), são marcantes na patogênese de alterações teciduais, como dos tecidos pulpare e periapicais (Hong et al., 2004), conduzem reações de destruição tecidual da polpa e periápice (Lin et al., 2001), estimulam a secreção de enzimas que degradam componentes da matriz extracelular – as metaloproteinases da matriz (MMP) – (Bodet et al., 2007) levando ao processo de destruição tecidual (Takahashi, 1998; Sorsa et al., 2004).

O TNF- α tem a capacidade de iniciar a cascata de ativação de outras citocinas, podendo ser secretado por diversas células e atuar através da interação com receptores específicos (sTNRF1). A IL-1 β interage com o receptor para IL-1 β tipo I (IL1RI), ocorrendo após esta interação, ativação por uma enzima específica, a proteinocinase (PKC) (McDermott, 2001).

Segundo Heinrich et al. (1990) e Watkins et al. (1995), em doenças inflamatórias, provavelmente as citocinas IL-1 β , IL-6, IL-8 e TNF- α estimulam o organismo a produzir febre, ao aumento do sono e da síntese de proteínas pelo fígado, à diminuição da ingestão de água e de alimentos, à elevação da liberação de corticosteróides, à alteração da atividade cerebral, à diminuição da interatividade social e aumento do estímulo à dor. Fatores que ocorrem no intuito de acelerar as atividades enzimáticas defensivas, reduzir a replicação de patógenos e aumentar a proliferação de células defensoras, além de isolar a área afetada e poupar energia.

Tem-se observado na literatura que diversos estudos utilizam o método de ativação celular e produção de diferentes citocinas para avaliar o potencial citotóxico ou o efeito anti-inflamatório de diferentes fitoterápicos, seja na forma de extratos ou de óleos essenciais (Park et al., 2005; Jung et al., 2006; Lee et al., 2011; Sheeja e Kuttan, 2010; Shih et al., 2010; Kim et al., 2011).

Desta forma, frente à crescente utilização de fitoterápicos nas diversas áreas de saúde, torna-se interessante estudar seus efeitos antimicrobianos correlacionando com seus possíveis efeitos citotóxicos, a fim de ampliar a utilização terapêutica segura destes produtos naturais. E ainda, selecionar um ou mais extratos que apresente uma aplicação mais específica em determinada área da saúde, como na odontológica, seja sua adição em dentifrícios, medicações para uso intracanal, colutórios, pomadas para aplicação intra-oral, entre outros.

3 PROPOSIÇÃO

Este estudo se propôs a:

1) Avaliar a atividade antimicrobiana dos extratos naturais de *Equisetum arvense* L. (cavalinha), *Glycyrrhiza glabra* L. (alcaçuz), *Punica granatum* L. (romã) e *Stryphnodendron barbatimam* Mart. (barbatimão) sobre cepas-padrão e isolados clínicos de bactérias das espécies *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Streptococcus mutans* e leveduras das espécies *Candida albicans*, *Candida glabrata* e *Candida tropicalis*, por meio de teste de microdiluição em caldo, determinando a concentração microbicida mínima;

2) Avaliar a citotoxicidade dos extratos naturais, descritos acima, em ensaio de viabilidade celular pelo método MTT e pela produção de citocinas (IL-1 β e TNF- α) em cultura de macrófagos de camundongos (RAW 264.7).

4 MATERIAIS E MÉTODOS

Esta pesquisa foi aprovada pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Odontologia de São José dos Campos – UNESP conforme protocolo 008/2010-PA/CEP (Anexo A).

4.1 Extratos naturais

Foram utilizados quatro extratos glicólicos de plantas cuja concentração foi de 200 mg/mL:

- a) *Equisetum arvense* L. (cavalinha);
- b) *Glycyrrhiza glabra* L. (alcaçuz);
- c) *Punica granatum* L. (romã);
- d) *Stryphnodendron barbatimam* Mart. (barbatimão).

4.1.1 Obtenção dos extratos

Foram adquiridos pós secos das plantas selecionadas para a pesquisa na empresa Oficina de Ervas (Ribeirão Preto, São Paulo, Brasil), e macerados por sete dias, abrigados da luz, com agitação ocasional para obtenção do extrato hidroetanólico, que por sua vez, após este período, foi filtrado em algodão e levado ao evaporador rotatório com temperatura máxima de 40°C para se obter os extratos brutos, que foram

diluídos em propilenoglicol até alcançar a concentração final de 200 mg/mL.

Os procedimentos de preparação dos extratos foram realizados em colaboração com as professoras doutoras Raquel Regina Duarte Moreira e Vera Lúcia Borges Isaac, da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Araraquara – UNESP.

4.2 Padronização dos inóculos para teste de diluição em caldo

4.2.1 Microrganismos

A ação dos extratos foi avaliada sobre uma cepa-padrão (ATCC - *American Type Culture Collection*) e nove cepas clínicas de seis espécies de microrganismos (*Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Streptococcus mutans*, *Candida albicans*, *Candida glabrata* e *Candida tropicalis*) provenientes do Laboratório de Microbiologia e Imunologia da Faculdade de Odontologia de São José dos Campos – UNESP. No Quadro 03 estão apresentadas as numerações das cepas-padrão (ATCC).

Quadro 03 - Cepas-padrão (ATCC) utilizadas para verificação da atividade antimicrobiana dos extratos naturais

Microrganismo	ATCC
Bactérias	
<i>Staphylococcus aureus</i>	6538
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	12228
<i>Streptococcus mutans</i>	35688
Leveduras	
<i>Candida albicans</i>	18804
<i>Candida tropicalis</i>	13803
<i>Candida glabrata</i>	90030

4.2.2 Preparação dos inóculos de *S. aureus* e *S. epidermidis*

As cepas de estafilococos foram semeadas em placas de Petri contendo ágar *Brain Heart Infusion* (BHI) (Himedia, Mumbai, Índia). Estas placas foram levadas para incubação por 24 horas, em estufa bacteriológica, à temperatura de 37°C.

A seguir, foi preparada suspensão do microrganismo, a partir de colônias isoladas (Figura 02 - A). Com auxílio da alça de platina tais colônias foram retiradas da placa e transferidas para tubos contendo 9 mL de solução fisiológica estéril (NaCl 0,9%) (Figura 02 - B) e com auxílio de um agitador de tubos (Vision Scientific) a cultura foi homogeneizada por 15 segundos (Figura 02 - C).

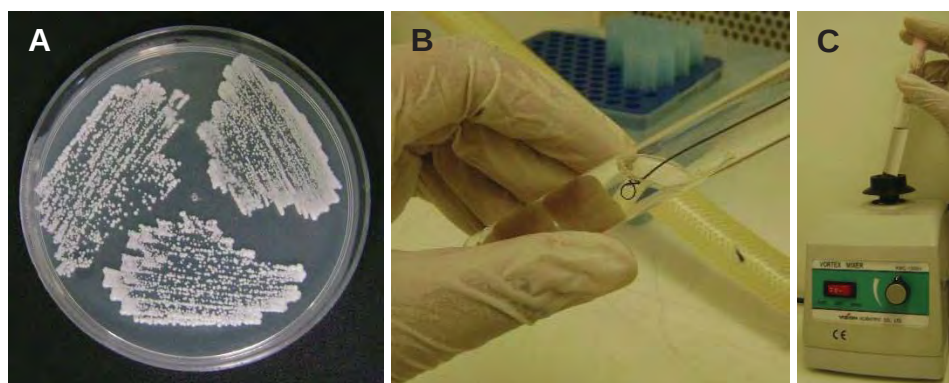


Figura 02 - (A) Placa com crescimento microbiano. (B) Suspensão de microrganismo em solução fisiológica estéril (NaCl 0,9%) para padronização do inóculo. (C) Homogeneização em agitador de tubos por 15 segundos.

Após a homogeneização da cultura, foi feito o ajuste de sua turbidez, semelhante à solução padrão McFarland de 0,5. Após esta padronização, foi realizada uma diluição de 1:10, para que a concentração final de bactérias fosse de aproximadamente 5×10^5 células/mL (NCCLS, 2003).

4.2.3 Preparação dos inóculos de *Streptococcus mutans*

Os estreptococos foram repicados em caldo *Tryptic Soy Broth* (TSB) (Acumedia, Michigan, EUA) a cada 48 horas, sendo mantidos em estufa bacteriológica sob microaerofilia, com 5% de CO₂ a 37°C.

Para a padronização do inóculo, as cepas foram cultivadas em ágar BHI respeitando-se o período de incubação de 24 horas à temperatura de 37°C, com 5% de CO₂. Foi ajustada a turbidez semelhante à solução padrão McFarland de 0,5 (NCCLS, 2003).

4.2.4 Preparação dos inóculos de *Candida* spp.

As leveduras foram cultivadas em placas com ágar Sabouraud-dextrose (Himedia, Mumbai, Índia) e incubadas em estufa bacteriológica a 37°C por 24 horas.

Para a padronização do inóculo, foram preparadas suspensões dos microrganismos em 9 mL de solução fisiológica estéril (NaCl 0,9%). O ajuste da turbidez das culturas de *Candida* spp. foi realizada em espectrofotômetro, utilizando-se o comprimento de onda de 530 nm e densidade óptica de 0,284, resultando em uma suspensão-padrão de 1×10^6 células de leveduras por mililitro. Esta suspensão-padrão foi diluída 1:50 e depois 1:20 em solução salina estéril (NaCl 0,9%), para obter-se a suspensão de trabalho com concentração de cerca de 5×10^2 a $2,5 \times 10^3$ células por mililitro (NCCLS, 2002).

4.3 Teste de microdiluição em caldo

Para determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM) dos extratos naturais e posterior constatação da Concentração Microbicida Mínima (CMM), foi utilizado o método de microdiluição em caldo realizado em placas de poliestireno de 96 poços, estéreis e com tampa (TPP, Suíça). A constatação da CIM foi feita a olho nu e determinada no poço onde não se observou turvação do meio (NCCLS, 2003). Através da microdiluição foram obtidas 10 diluições seriadas dos extratos naturais de *E. arvense* L. (cavalinha), *G. glabra* L. (alcaçuz), *P. granatum* L. (romã) e *S. barbatimam* Mart. (barbatimão), como apresentado no Quadro 04.

Quadro 04 - Concentrações dos extratos naturais (mg/mL) utilizados no estudo

Diluição		Concentração (mg/mL)
1 ^a	1:2	100
2 ^a	1:4	50
3 ^a	1:8	25
4 ^a	1:16	12,5
5 ^a	1:32	6,25
6 ^a	1:64	3,13
7 ^a	1:128	1,56
8 ^a	1:256	0,78
9 ^a	1:512	0,39
10 ^a	1:1024	0,19

4.3.1 Meios de cultura

Para as cepas bacterianas foi utilizado caldo Mueller-Hinton (Himedia, Mumbai, Índia) e para as leveduras o meio sintético RPMI 1640 (com glutamina, sem bicarbonato e com indicador vermelho de fenol) (Himedia, Mumbai, Índia) tamponado com MOPS [ácido 3-(N-morfolino) propanosulfônico] (Sigma Aldrich Co., Alemanha) a pH $7,0 \pm 0,1$ (NCCLS, 2002; 2003).

4.3.2 Disposição nas placas de microdiluição

As diluições dos extratos foram dispostas entre as colunas de 1 a 10 (Figura 03 – A). A coluna 12 foi utilizada para os grupos

controle, sendo um poço para crescimento, com meio e suspensão do inóculo (Figura 03 – C) e um poço não inoculado, apenas com meio (Figura 03 - D). Os testes foram realizados em duplicata, com isso, cada placa acomodou quatro cepas diferentes dos microrganismos utilizados no estudo.

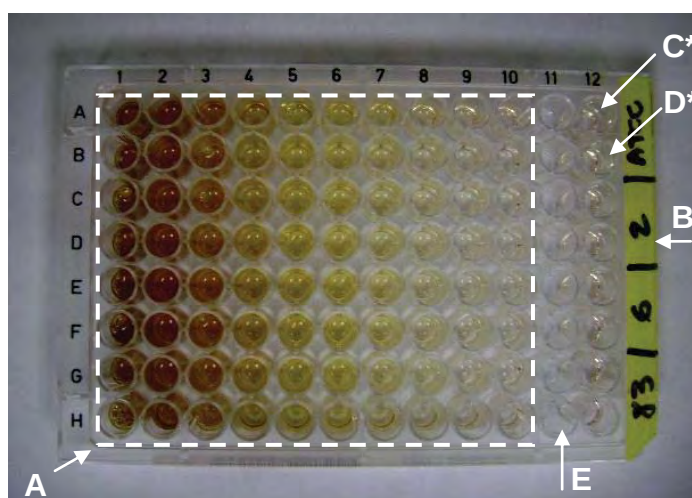


Figura 03 - Teste de microdiluição. (A) Dez diluições do extrato natural, Grupo Experimental. (B) Código da cepa do microrganismo. (C) Poço de controle positivo: meio e inóculo. (D) Poço não inoculado. (E) Coluna 11 não utilizada. (*) Todas as cepas tiveram poços para controles.

As placas contendo cepas bacterianas foram preenchidas com 100 μ L do meio de cultura (caldo Mueller-Hinton) com auxílio de um micropipetador multicanal. Na coluna 1 foram acrescentados 100 μ L do extrato natural, de onde iniciou sua diluição, ficando com a menor diluição a décima coluna (Quadro 04). Após as diluições do extrato no meio de cultura foram adicionados 5 μ L do inóculo padronizado em solução salina estéril (NaCl 0,9%) em todos os poços, exceto nos poços para controle negativo e coluna 11.

As placas contendo cepas de leveduras foram preenchidas com 100 μ L de meio de cultura (RPMI 1640), 100 μ L de

extrato natural, apenas na primeira coluna, de onde partiram as diluições seriadas e 100 µL da suspensão padronizada de microrganismo.

As placas foram levadas à estufa bacteriológica por 24 horas, à temperatura de 37°C, respeitando as condições de microaerofilia para *S. mutans*.

Após incubação, foi realizada análise macroscópica dos poços (a olho nu). Quando eram observadas turvações significou que a concentração do extrato foi insuficiente para inibir o crescimento microbiano. Quando o meio ficou translúcido, foi semeado 100 µL deste poço, do poço anterior e do poço posterior em placas de Petri contendo ágar BHI para o cultivo de espécies bacterianas e ágar Sabouraud-dextrose para as fúngicas, no objetivo de se obter a CMM.

Estas placas foram incubadas por um período de 48 horas à temperatura de 37°C. Nas placas onde ocorreu ausência de crescimento de colônias foi constatada a Concentração Bactericida Mínima (CBM) ou a Concentração Fungicida Mínima (CFM).

4.4 Avaliação da citotoxicidade dos extratos naturais

A avaliação da citotoxicidade dos extratos foi realizada por dois ensaios diferentes: a) análise da atividade mitocondrial das células, pelo método MTT; e b) produção de citocinas (IL-1 β e TNF- α). Para ambas análises, foi utilizada cultura de macrófagos (RAW 264.7)

4.4.1 Cultivo da cultura de macrófagos (RAW 264.7)

Foram utilizados macrófagos de camundongos da linhagem RAW 264.7 (Figura 04), provenientes do Laboratório de Cultura de Células do Laboratório de Microbiologia e Imunologia da FOSJC – UNESP, obtidas do banco de células da Associação Técnico Científica Paul Ehrlich (APABCAM – RJ).

As células foram cultivadas em meio de cultura Eagle modificado por Dulbecco (DMEM) (LGC Biotecnologia, Cotia, Brasil), suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB) (Invitrogen, Nova York, EUA), em frascos de cultivo celular (TPP, Suíça) e incubadas em estufa à temperatura de 37°C, com umidade atmosférica, contendo 95% de ar e 5% de CO₂.

O meio de cultura foi trocado a cada dois dias e houve monitoramento de cada frasco de cultivo celular com auxílio de microscópio com luz invertida (Nikon).

A partir do momento que foi constatado estado de subconfluência das células, caracterizado pela ocupação de mais de 70% do frasco, foram realizados subcultivos celulares (Figura 04 - E).

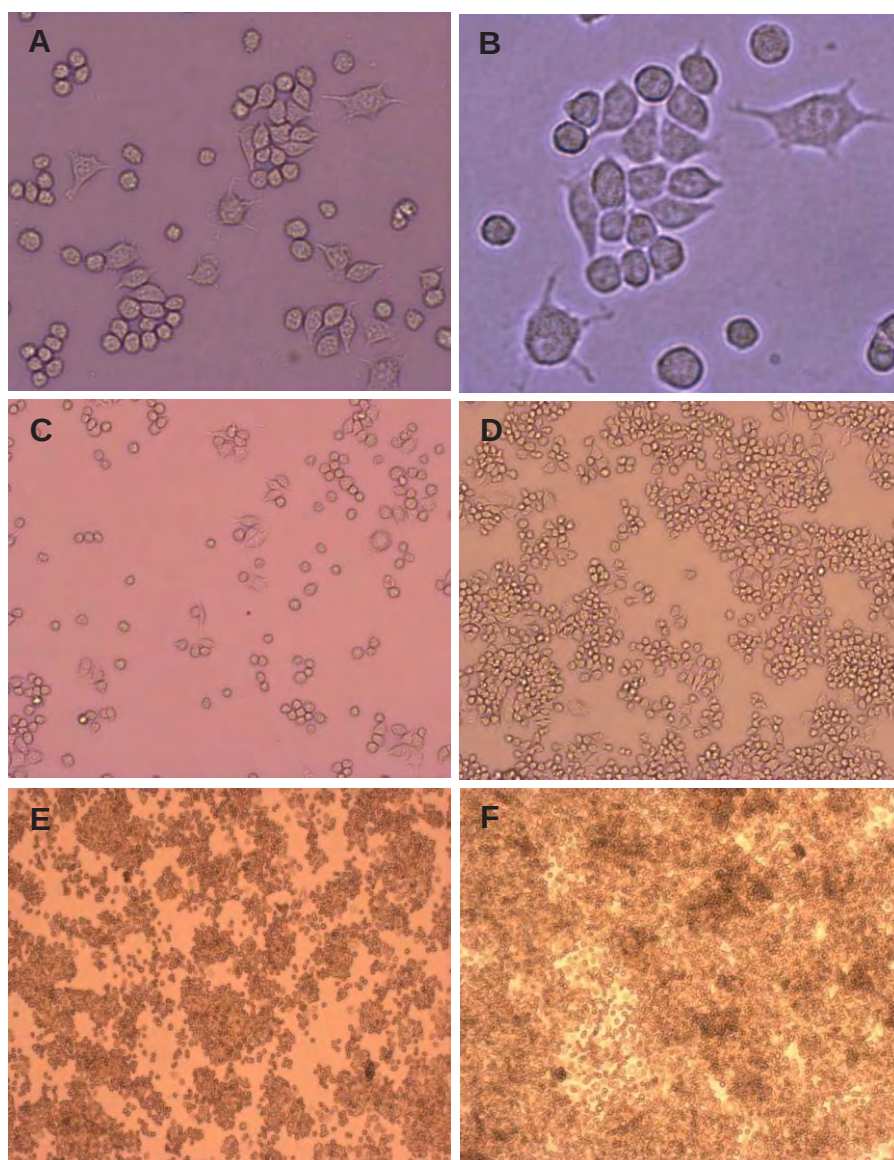


Figura 04 - Cultura de macrófagos de camundongo (RAW 264.7). (A e B) Morfologia celular dos macrófagos. Períodos de cultivo: (C) 24 horas; (D) 48 horas; (E) 72 horas, subconfluência celular; e (F) 96 horas. Microscopia óptica, aumento de 200X (A), 400X (B), 100X (C e D) e 50X (E e F).

Para o subcultivo, o meio DMEM do frasco para cultura celular foi aspirado com auxílio de uma pipeta aprotogênica e descartado (Figura 05 - A). A seguir, as células foram lavadas com 3 mL de meio fresco e depois este também foi descartado.

Posteriormente, foram acrescentados mais 3 mL de meio fresco e as células foram removidas cuidadosamente do frasco de cultivo com auxílio de um varredor celular (TPP, Suíça) (Figura 05 - B).

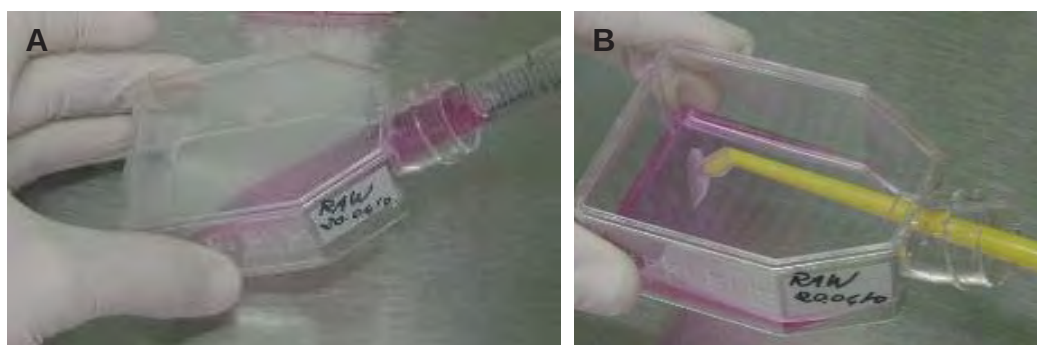


Figura 05 - (A) Aspiração do meio DMEM do frasco de cultivo celular. (B) Remoção das células aderidas no fundo do frasco de cultura com varredor celular.

O meio fresco contendo a suspensão de células foi centrifugado, em tubo tipo Falcon (TPP, Suíça), a 9 mil rpm durante cinco minutos, a 25°C. Após a centrifugação, o sobrenadante foi desprezado e as células foram ressuspensas em meio fresco e distribuídas em novos frascos de cultivo celular (Figura 06).

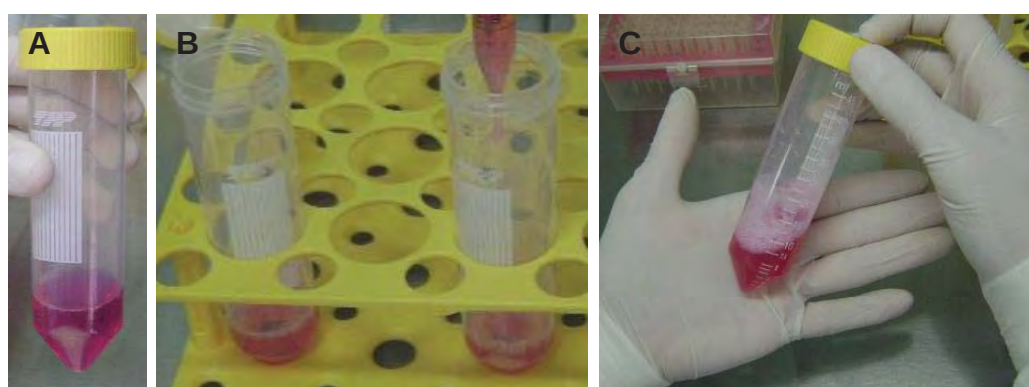


Figura 06 - (A) Após centrifugação (9 mil rpm por cinco minutos, a 25°C) as células se agrupam no fundo do tubo. (B) O sobrenadante é descartado e adicionado meio fresco. (C) Homogeneização das células com o meio fresco.

4.4.2 Contagem das células viáveis

Para realização do teste de citotoxicidade, foram realizados os mesmos procedimentos citados para o subcultivo da linhagem celular, no entanto, após a ressuspensão das células foi realizada a contagem de células viáveis.

Para tanto, uma amostra de 50 μL da ressuspensão foi colocada em um microtubo tipo eppendorf juntamente com 5 μL de corante azul de Trypan 0,5% (Sigma). Esta mistura foi agitada com uma pipeta e transferidos 10 μL para a câmara de Neubauer, coberta com lamínula (Figura 07 - A). A contagem de células viáveis foi realizada em microscopia óptica, sendo consideradas viáveis as células não coradas pelo azul de Trypan (Figura 07 - B).

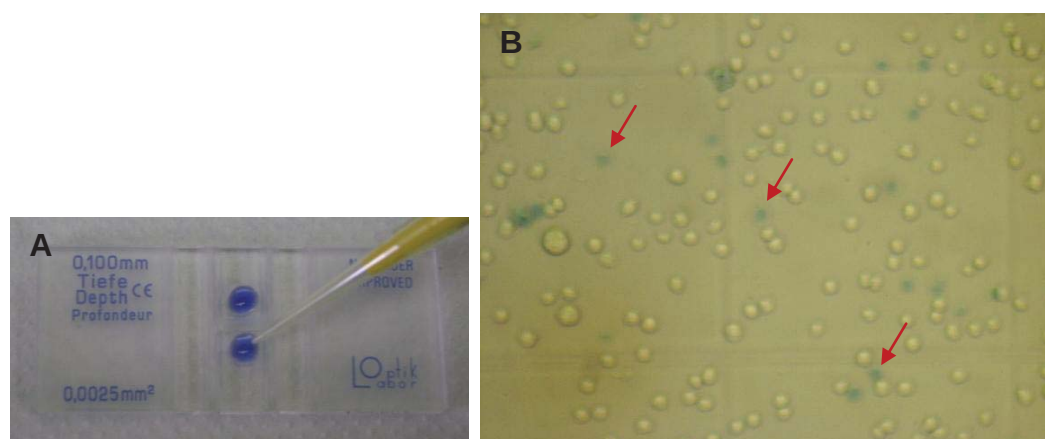


Figura 07 - (A) Câmara de Neubauer com alíquotas de 10 μL do material celular corado com azul de Trypan em microtubo, após ressuspensão das células. (B) Vista da câmara de Neubauer em microscópio óptico (aumento de 200X). As células coradas em azul são consideradas inviáveis (setas).

4.4.3 Ensaio de citotoxicidade dos extratos naturais com MTT

Foi realizada análise da atividade mitocondrial das células viáveis pelo método de redução do brometo de 3(4,5-dimetiltiazol-2-yl)2,5-difeniltetrazólio (MTT) em formazina. A solução de MTT foi preparada a partir da suspensão de 0,5 mg do pó de MTT (Sigma Aldrich Co., Alemanha) em 1 mL de *Phosphate Buffer Saline* (PBS) (Cultilab, Brasil) esterilizado.

Foram utilizadas microplacas de 96 poços estéreis e com tampa (Nunc, Dinamarca). Em cada poço foram adicionados 200 μ L de meio DMEM + 10% SFB contendo 8×10^3 células viáveis. Após, as placas foram incubadas em estufa a 37°C, com 5% de CO₂, por 24 horas para que ocorresse aderência das células nos poços (Figura 08).

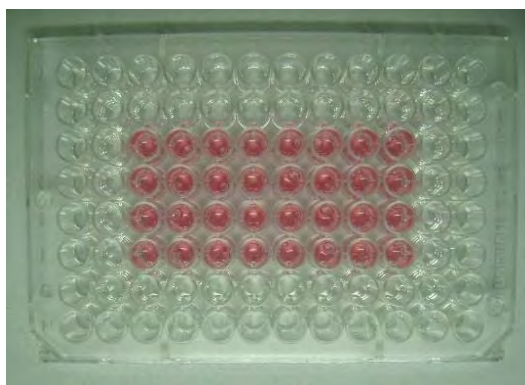


Figura 08 - Adição de 200 μ L de DMEM + 10% SFB contendo 8×10^3 células viáveis nos poços da microplaca.

Passado o período de incubação e aderência das células nos poços da placa, o sobrenadante foi removido e acrescentado 200 μ L da concentração dos extratos naturais obtida no teste de microdiluição em caldo (Item 4.3).

Para essa finalidade, foi realizada diluição seriada (de 100 mg/mL a 1,56 mg/mL) dos extratos naturais em meio DMEM + 10% SFB (Figura 09). Inicialmente foi colocado em todos os poços 1 mL de meio DMEM + 10% SFB e no primeiro poço mais 1 mL do extrato natural, após agitação com auxílio de pipeta, foi transferido para o segundo poço 1 mL da mistura do primeiro poço. A diluição seguiu-se, desta forma, até quando foi obtida a última concentração desejada.



Figura 09 - Diluição seriada do extrato natural em meio DMEM + 10% SFB em placa de 24 poços.

Desta forma, foram adicionados 200 μ L de cada concentração do extrato na microplaca de 96 poços, onde houve aderência celular. O teste foi realizado em triplicata, com isso cada grupo celular tratado foi composto por 12 amostras de cada diluição (Figura 10). As placas foram levadas para incubação por 24 horas, em estufa a 37°C e 5% de CO₂.

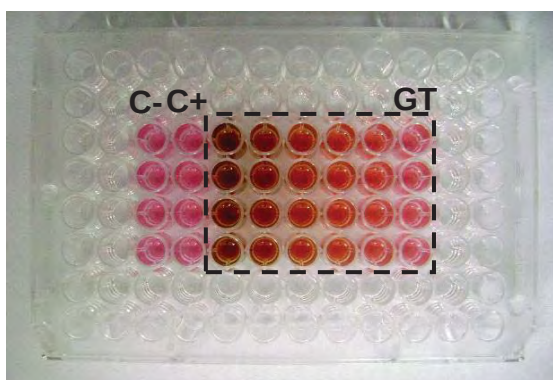


Figura 10 - Placa de 96 poços contendo os grupos testados: C- controle negativo, apenas meio DMEM + 10% SFB; C+ controle positivo, meio DMEM + 10% SFB com 8×10^3 células; GT grupos tratados com concentrações do extrato natural (cada coluna comportou uma diluição do extrato natural).

Após a remoção do conteúdo dos poços, estes foram lavados por três vezes com 200 μ L de PBS estéril para se descartar células mortas e precipitados do extrato natural. Após, foram acrescentados 100 μ L da solução de MTT em cada poço (Figura 11).



Figura 11 - Adição de 100 μ L da solução de MTT nos poços da placa

As placas com a solução de MTT foram cobertas por papel alumínio e levadas a estufa por uma hora, sob temperatura de 37° e 5% de CO₂. Passado o período de uma hora, a solução de MTT foi

removida e foram adicionados 100 µL de dimetil sulfóxido (99,9%) - DMSO (Sigma Aldrich Co., Alemanha) para solubilização do conteúdo dos poços.

As placas envolvidas em papel alumínio retornaram à incubação por 10 minutos. Após este período, as placas foram levadas a mesa agitadora orbital (Solab) por mais 10 minutos. Posteriormente, foi feita a leitura da absorbância dos poços em espectrofotômetro de microplacas (Bio-Tek, Vermont, EUA), com comprimento de onda de 570 nm.

As densidades ópticas (DO) foram convertidas em porcentagem de viabilidade celular (Ferreira, 2010) empregando-se a seguinte fórmula:

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

4.4.4 Ensaio de citotoxicidade dos extratos naturais pela produção de citocinas IL-1 β e TNF- α por macrófagos

Após a preparação da suspensão celular (macrófagos RAW 264.7), como descrito nos itens 4.4.1 e 4.4.2, foram depositados em placas de poliestireno de 24 poços (Nunc, Dinamarca) 1×10^6 células viáveis por poço, sendo o volume completado com meio DMEM + 10% SFB para 1 mL (Figura 12 - A). As placas foram levadas para incubação por 24 horas em estufa a 37°C, com 5% de CO₂, para aderência das células.

Passadas 24 horas o meio foi removido e foram adicionadas as concentrações microbicidas dos extratos (Quadro 05) nos grupos tratados e nos grupos controle foi adicionado meio DMEM + 10%

SFB, sendo n=12 para todos os grupos. As placas seguiram novamente para incubação, pelo período de 24 horas (Figura 12 – B).

Quadro 05 – Concentrações microbicidas dos extratos utilizadas no ensaio de citotoxicidade pela produção de IL-1 β e TNF- α por macrófagos

Grupo	Concentração (mg/mL)	n
<i>E. arvense</i> L. (cavalinha)	50	12
<i>G. glabra</i> (alcaçuz)	100	12
<i>P. granatum</i> L. (romã)	50	12
<i>S. barbatimam</i> Mart. (barbatimão)	50	12
Controle positivo	-	12

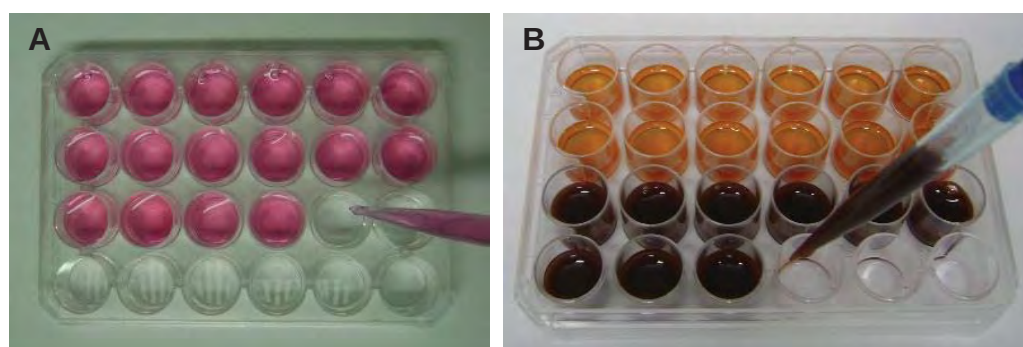


Figura 12 - (A) Preparação da placa de 24 poços com 1×10^6 células viáveis por poço com adição de meio DMEM + 10% SFB até completar 1 mL de volume. (B) Adição da concentração dos extratos naturais em culturas celulares de 24 horas de aderência após remoção do meio de cultura.

Após o período de exposição às concentrações dos extratos naturais, os sobrenadantes de todos os grupos foram coletados, armazenados em microtubos tipo eppendorf (Axygen, EUA) e congelados em freezer (-20°C) para posterior quantificação de citocinas pelo teste imunoenzimático ELISA.

4.4.4.1 Ensaio imunoenzimático ELISA

Para o teste ELISA foram utilizados Kits comerciais *DuoSet ELISA Development System* para IL-1 β (catálogo DY401) e para TNF- α (catálogo DY410) (R & D Systems, Minneapolis, EUA).

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

Posteriormente, o conteúdo foi removido dos poços e estes foram lavados com 300 μ L de Tampão de Lavagem (PBS acrescido de 0,05% de *Tween* 20) por três vezes com auxílio de pipetador multicanal. Após a terceira lavagem foram adicionados em cada poço 300 μ L de Tampão de Bloqueio composto por PBS acrescido de 0,1% de Soro Albumina Bovino (BSA). As placas foram deixadas em temperatura ambiente por uma hora.

Passado período de incubação os procedimentos de lavagem foram realizados, posteriormente foram adicionados nas placas 100 μ L do padrão de citocinas (curva-padrão), 100 μ L das amostras de sobrenadantes obtidos após exposição às concentrações dos extratos naturais e 100 μ L do sobrenadante obtidos no grupo controle. Os testes foram feitos em duplicata para cada amostra (Figura 13). As placas foram incubadas por duas horas em temperatura ambiente.

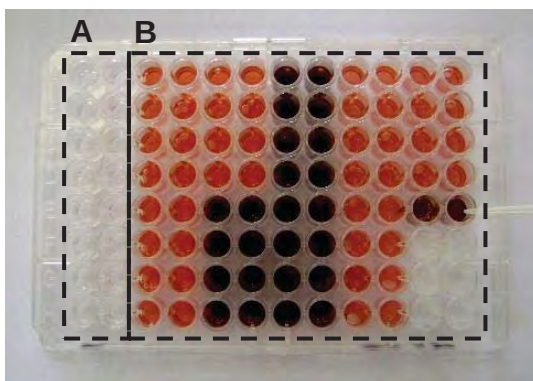


Figura 13 - Distribuição das amostras na microplaca para teste ELISA, após sensibilização com anticorpos de captura e bloqueio. (A) Curva-padrão de citocinas. (B) Adição do sobrenadante adquirido do contato das células com as concentrações dos extratos naturais (n=12) distribuídos em duplicata.

Após os procedimentos de lavagem, foram acrescentados em cada poço das placas 100 μ L de anticorpo de detecção (anti-IL-1 β ou anti-TNF- α) marcado com biotina. As placas foram mantidas em temperatura ambiente por duas horas. Novas lavagens foram feitas e logo após foram adicionados em cada poço 100 μ L de estreptavidina conjugada com enzima peroxidase. As placas foram cobertas com papel alumínio e incubadas em temperatura ambiente por 20 minutos.

Após os procedimentos de lavagem foram adicionados em cada poço 100 μ L da solução de substrato cromogênico, composto por Reagente A (peróxido de hidrogênio) e Reagente B (tetrametilbenzidina) na proporção de 1:1 (Figura 14 - A). As placas foram incubadas, recobertas com papel alumínio, à temperatura ambiente por 20 minutos.

Logo após, foram adicionados 50 μ L da Solução de Parada (ácido sulfúrico 2N) (Figura 14 - B). As placas foram imediatamente levadas ao leitor de microplacas, para obtenção das DO de cada poço, no comprimento de onda de 450 nm.

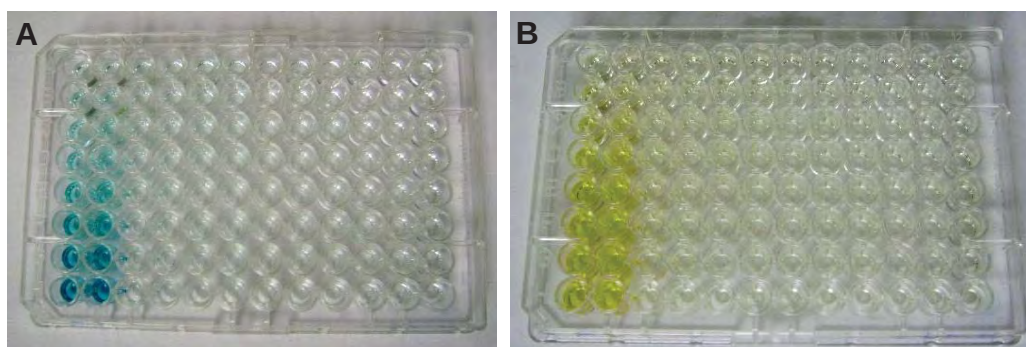


Figura 14 - (A) Reação revelada com substrato cromogênico após incubação das amostras com anticorpo de detecção marcado com biotina. (B) Bloqueio da reação revelada com adição do ácido sulfúrico 2N.

Após obtenção das DO foram determinados os níveis de IL-1 β e TNF- α das amostras de sobrenadantes celulares com auxílio do programa GraphPad Prism 4.0.

4.5 Análise estatística

Todos os dados foram analisados estatisticamente pela análise de variância ANOVA, complementado pelo teste de Tukey a fim de verificar as diferenças estatísticas significantes entre grupos. O nível de significância foi de 5% ($p \leq 0,05$). A análise estatística foi realizada através do programa BioEstat 5.0.

5 RESULTADOS

5.1 Concentração Microbicida Mínima (CMM) dos extratos naturais

5.1.1 *Equisetum arvense* L. (cavalinha)

As CMM (mg/mL) do extrato natural de *E. arvense* L. (cavalinha) para cepas de *S. aureus*, *S. epidermidis*, *S. mutans*, *C. albicans*, *C. tropicalis* e *C. glabrata* estão apresentadas na Tabela 01.

Tabela 01 - Valores das CMM (mg/mL) do extrato natural de *E. arvense* L. (cavalinha) para cepas bacterianas e fúngicas

Cepa	Bactérias			Leveduras		
	Sa	Se	Sm	Ca	Ct	Cg
ATCC	50	25	3,13	50	25	50
1	12,5	50	3,13	50	50	50
2	50	50	25	50	50	50
3	50	50	25	50	25	50
4	50	25	25	50	25	50
5	50	12,5	12,5	25	50	50
6	50	50	3,13	12,5	25	50
7	6,25	25	12,5	12,5	25	25
8	6,25	25	12,5	25	25	50
9	25	6,25	12,5	12,5	25	50

Sa (*S. aureus*), Se (*S. epidermidis*), Sm (*S. mutans*), Ca (*C. albicans*), Ct (*C. tropicalis*) e Cg (*C. glabrata*)

Na Tabela 02 estão apresentadas as quantidades de cepas dos microrganismos eliminadas em cada CMM do extrato natural de *E. arvense* L. (cavalinha), bem como as concentrações não efetivas.

Tabela 02 - Quantidades de cepas bacterianas e fúngicas eliminadas sob concentrações do extrato natural de *E. arvense* L. (cavalinha)

Microrganismo	Concentração (mg/mL)									
	100	50	25	12,5	6,25	3,13	1,56	0,78	0,39	0,19
<i>S. aureus</i>	10	10*	4	3	2	-	-	-	-	-
<i>S. epidermidis</i>	10	10	6*	2	1	-	-	-	-	-
<i>S. mutans</i>	10	10	10	7	3	3*	-	-	-	-
<i>C. albicans</i>	10	10*	5	3	-	-	-	-	-	-
<i>C. tropicalis</i>	10	10	7*	-	-	-	-	-	-	-
<i>C. glabrata</i>	10	10*	1	-	-	-	-	-	-	-

- concentração não efetiva; *CMM obtida em cepa-padrão (ATCC).

Em *S. aureus*, as concentrações de 100 e 50 mg/mL eliminaram todas as cepas. No entanto, concentrações inferiores como 25, 12,5 e 6,25 mg/mL também apresentaram atividade microbica, com eliminações de 40, 30 e 20% respectivamente. Diluições inferiores a 6,25 mg/mL não foram efetivas para as cepas testadas. Contudo, a CMM₅₀ do extrato de cavalinha para *S. aureus* foi 50 mg/mL.

Para *S. epidermidis*, houve eliminação total de cepas nas concentrações de 100 e 50 mg/mL. A concentração de 25 mg/mL foi efetiva para 60% das cepas. Nas concentrações de 12,5 e 6,25 mg/mL a eliminação foi de 20 e 10% dos isolados respectivamente. Em diluições inferiores a 6,25 mg/mL não foi observada atividade microbica. Desta forma, a CMM₅₀ do extrato de cavalinha para *S. epidermidis* foi 25 mg/mL.

Para *S. mutans*, ocorreu eliminação de 100% das cepas nas concentrações de 100, 50 e 25 mg/mL. Sob a concentração de

12,5 mg/mL 70% das cepas foram eliminadas e nas concentrações de 6,25 e 3,13 mg/mL o percentual de eliminação foi de 30% para cada uma. Em diluições inferiores a 3,13 mg/mL foi observado crescimento microbiano. Com isso, a CMM₅₀ do extrato de cavalinha para *S. mutans* foi 12,5 mg/mL.

Em cepas de *C. albicans*, as concentrações de 100 e 50 mg/mL promoveram eliminação total dos isolado. Na concentração de 25 mg/mL houve eliminação de 50% das cepas e na concentração de 12,5 mg/mL 30%. Em diluições inferiores a 12,5 mg/mL não foi constatada atividade microbica. Desta forma, a CMM₅₀ do extrato de cavalinha para *C. albicans* foi 25 mg/mL.

Para *C. tropicalis*, 100% das cepas foram eliminadas com concentrações de 100 e 50 mg/mL e 70% com 25 mg/mL, no entanto, em concentrações inferiores não houve eliminação de cepas. Com isso, a CMM₅₀ do extrato de cavalinha para *C. tropicalis* foi 25 mg/mL.

Em *C. glabrata*, as concentrações de 100 e 50 foram efetivas para todas as cepas, contudo a concentração de 25 mg/mL foi responsável pela eliminação de uma cepa. Assim, a CMM₅₀ do extrato de cavalinha para *C. glabrata* foi 50 mg/mL.

5.1.2 *Glycyrrhiza glabra* L. (alcaçuz)

Os resultados das CMM (mg/mL) do extrato natural de *G. glabra* L. (alcaçuz) sob cepas de *S. aureus*, *S. epidermidis*, *S. mutans*, *C. albicans*, *C. tropicalis* e *C. glabrata* estão descritos na Tabela 03.

Tabela 03 - Valores das CMM (mg/mL) do extrato natural de *G. glabra* L. (alcaçuz) para cepas bacterianas e fúngicas

Cepa	Bactérias			Leveduras		
	Sa	Se	Sm	Ca	Ct	Cg
ATCC	100	50	12,5	50	50	50
1	50	100	12,5	50	50	50
2	100	50	50	50	50	50
3	100	100	100	50	50	50
4	25	50	50	50	25	50
5	50	25	50	50	50	50
6	50	50	50	50	25	50
7	25	100	50	12,5	12,5	25
8	25	50	50	25	25	50
9	50	50	50	25	25	50

Sa (*S. aureus*), Se (*S. epidermidis*), Sm (*S. mutans*), Ca (*C. albicans*), Ct (*C. tropicalis*) e Cg (*C. glabrata*)

As quantidades de cepas dos microrganismos eliminadas em cada CMM do extrato natural de *G. glabra* L. (alcaçuz), bem como as concentrações não efetivas estão demonstradas na Tabela 04.

Tabela 04 - Quantidades de cepas bacterianas e fúngicas eliminadas sob concentrações do extrato natural de *G. glabra* L. (alcaçuz)

Microrganismo	Concentração (mg/mL)									
	100	50	25	12,5	6,25	3,13	1,56	0,78	0,39	0,19
<i>S. aureus</i>	10*	7	3	-	-	-	-	-	-	-
<i>S. epidermidis</i>	10	7*	1	-	-	-	-	-	-	-
<i>S. mutans</i>	10	9	2	2*	-	-	-	-	-	-
<i>C. albicans</i>	10	10*	4	1	-	-	-	-	-	-
<i>C. tropicalis</i>	10	10*	5	1	-	-	-	-	-	-
<i>C. glabrata</i>	10	10*	1	-	-	-	-	-	-	-

- concentração não efetiva; *CMM obtida em cepa-padrão (ATCC).

Em cepas de *S. aureus*, a concentração de 100 mg/mL eliminou 100% das cepas, nas concentrações de 50 e 25 mg/mL os percentuais de eliminação das cepas foram de 70 e 30% respectivamente. Em concentrações inferiores a 25 mg/mL não foi comprovada atividade microbica. Com isso, a CMM₅₀ do extrato de alcaçuz para *S. aureus* foi 50 mg/mL.

Para *S. epidermidis*, ocorreu eliminação de todas as cepas sob a concentração de 100 mg/mL. A concentração de 50 mg/mL eliminou 70% das cepas e a concentração de 25 mg/mL 10%. Não houve eliminação microbiana em concentrações inferiores a 25 mg/mL. Assim, a CMM₅₀ do extrato de alcaçuz para *S. epidermidis* foi 50 mg/mL.

Em *S. mutans*, houve eliminação de 100% das cepas na concentração de 100 mg/mL, 90% a 50 mg/mL e 20% de eliminação nas concentrações de 25 e 12,5 mg/mL, em cada uma. No entanto, em concentrações inferiores a 12,5 mg/mL não foi constatada atividade microbica. Desta forma, a CMM₅₀ do extrato de alcaçuz para *S. mutans* foi 50 mg/mL.

Para cepas de *C. albicans*, as concentrações de 100 e 50 mg/mL foram efetivas para 100% das cepas, em cada uma. No entanto, foi constatado eliminação de 40 e 10% das cepas nas concentrações de 25 e 12,5 mg/mL respectivamente, porém em diluições inferiores a 12,5 mg/mL não foi observada atividade microbica. Sendo assim, a CMM₅₀ do extrato de alcaçuz para *C. albicans* foi 50 mg/mL.

Em cepas de *C. tropicalis*, houve eliminação total nas concentrações de 100 e 50 mg/mL, 50% foram eliminadas a 25 mg/mL e 10% a 12,5 mg/mL. Em concentrações inferiores a 12,5 mg/mL não foi constatado eliminação fúngica. Com isso, a CMM₅₀ do extrato de alcaçuz para *C. tropicalis* foi 25 mg/mL.

Em *C. glabrata*, as concentrações de 100 e 50 mg/mL foram efetivas para todas as cepas, com 100% de eliminação dos isolados. Foi observado na concentração de 25 mg/mL eliminação de

10% das cepas, contudo em diluições inferiores houve crescimento fúngico. Desta forma, a CMM₅₀ do extrato de alcaçuz para *C. glabrata* foi 50 mg/mL.

5.1.3 *Punica granatum* L. (romã)

Os valores das CMM (mg/mL) do extrato natural de *P. granatum* L. (romã) testados sob as cepas de *S. aureus*, *S. epidermidis*, *S. mutans*, *C. albicans*, *C. tropicalis* e *C. glabrata* estão demonstrados na Tabela 05.

Tabela 05 - Valores das CMM (mg/mL) do extrato natural de *P. granatum* L. (romã) para cepas bacterianas e fúngicas

Cepa	Bactérias			Leveduras		
	Sa	Se	Sm	Ca	Ct	Cg
ATCC	25	12,5	3,13	50	25	25
1	12,5	25	3,13	50	50	50
2	12,5	25	6,25	50	25	25
3	12,5	6,25	6,25	25	25	25
4	12,5	12,5	6,25	25	25	25
5	12,5	3,13	6,25	25	50	50
6	6,25	12,5	3,13	25	25	50
7	25	3,13	6,25	25	25	12,5
8	25	3,13	12,5	25	25	50
9	6,25	3,13	6,25	25	25	25

Sa (*S. aureus*), Se (*S. epidermidis*), Sm (*S. mutans*), Ca (*C. albicans*), Ct (*C. tropicalis*) e Cg (*C. glabrata*)

Na Tabela 06 estão apresentadas as quantidades de cepas microbianas eliminadas com as CMM do extrato natural de *P. granatum* L. (romã), bem como as concentrações não efetivas.

Tabela 06 - Quantidades de cepas bacterianas e fúngicas eliminadas sob concentrações do extrato natural de *P. granatum* L. (romã)

Microrganismo	Concentração (mg/mL)									
	100	50	25	12,5	6,25	3,13	1,56	0,78	0,39	0,19
<i>S. aureus</i>	10	10	10*	7	2	-	-	-	-	-
<i>S. epidermidis</i>	10	10	10	8*	5	4	-	-	-	-
<i>S. mutans</i>	10	10	10	10	9	3*	-	-	-	-
<i>C. albicans</i>	10	10*	7	-	-	-	-	-	-	-
<i>C. tropicalis</i>	10	10	8*	-	-	-	-	-	-	-
<i>C. glabrata</i>	10	10	6*	1	-	-	-	-	-	-

- concentração não efetiva; *CMM obtida em cepa-padrão (ATCC).

Em *S. aureus*, houve eliminação total de cepas nas concentrações de 100, 50 e 25 mg/mL. A concentração de 12,5 mg/mL eliminou 70% dos isolados e a concentração de 6,25 mg/mL 20%, contudo em diluições inferiores não se observou atividade microbicida. Com isso, a CMM₅₀ do extrato de romã para *S. aureus* foi 12,5 mg/mL.

Em cepas de *S. epidermidis*, as concentrações de 100, 50 e 25 mg/mL eliminaram 100% das cepas, contudo foi constatada eliminação de 80% dos isolados à concentração de 12,5 mg/mL, de 50% a 6,25 mg/mL e de 40% a 3,13 mg/mL. Em concentrações inferiores a 3,13 mg/mL não houve efetividade para as cepas testadas. Desta forma, a CMM₅₀ do extrato de romã para *S. epidermidis* foi 6,25 mg/mL.

Para *S. mutans*, ocorreu eliminação total dos isolados sob as concentrações de 100, 50, 25 e 12,5 mg/mL, eliminação de 90% na concentração de 6,25 mg/mL e de 30% a 3,13 mg/mL, contudo, em

diluições inferiores não foi observada atividade microbicida. Assim, a CMM₅₀ do extrato de romã para *S. mutans* foi 6,25 mg/mL.

Em cepas de *C. albicans*, houve eliminação de 100% das cepas nas concentrações de 100 e 50 mg/mL e de 70% na concentração de 25 mg/mL, em concentrações inferiores não foi observada atividade microbicida. Desta maneira, a CMM₅₀ do extrato de romã para *C. albicans* foi 25 mg/mL.

Para *C. tropicalis*, 100 % das cepas foram eliminadas sob as concentrações de 100 e 50 mg/mL e 80% a 25 mg/mL. Em concentrações inferiores a 25 mg/mL foi constatado crescimento de leveduras. Com isso, a CMM₅₀ do extrato de romã para *C. tropicalis* também foi 25 mg/mL.

Para cepas de *C. glabrata*, houve eliminação total nas concentrações de 100 e 50 mg/mL, eliminação de 60% a 25 mg/mL e 10% de eliminação dos isolados na concentração de 12,5 mg/mL. Não se constatou efeito microbicida em concentrações inferiores. Sendo assim, a CMM₅₀ do extrato de romã para *C. glabrata* também foi 25 mg/mL.

5.1.4 *Stryphnodendron barbatimam* Mart. (barbatimão)

Na Tabela 07 são observados os valores das CMM (mg/mL) do extrato natural de *S. barbatimam* Mart. (barbatimão) sob cepas de *S. aureus*, *S. epidermidis*, *S. mutans*, *C. albicans*, *C. tropicalis* e *C. glabrata*.

Tabela 07 - Valores das CMM (mg/mL) do extrato natural de *S. barbatimam* Mart. (barbatimão) para cepas bacterianas e fúngicas

Cepa	Bactérias			Leveduras		
	Sa	Se	Sm	Ca	Ct	Cg
ATCC	25	1,56	3,13	25	25	50
1	12,5	6,25	3,13	25	50	50
2	12,5	6,25	3,13	50	50	50
3	12,5	3,13	3,13	25	25	50
4	12,5	3,13	3,13	25	25	25
5	12,5	3,13	3,13	25	50	50
6	6,25	12,5	3,13	25	12,5	50
7	6,25	3,13	3,13	25	12,5	50
8	6,25	3,13	3,13	25	12,5	50
9	6,25	3,13	3,13	12,5	25	50

Sa (*S. aureus*), Se (*S. epidermidis*), Sm (*S. mutans*), Ca (*C. albicans*), Ct (*C. tropicalis*) e Cg (*C. glabrata*)

Na Tabela 08 estão descritas as quantidades de cepas microbianas eliminadas em cada CMM do extrato natural de *S. barbatimam* Mart. (barbatimão), além das concentrações não efetivas.

Tabela 08 - Quantidades de cepas bacterianas e fúngicas eliminadas sob concentrações do extrato natural de *S. barbatimam* Mart. (barbatimão)

Microrganismo	Concentração (mg/mL)									
	100	50	25	12,5	6,25	3,13	1,56	0,78	0,39	0,19
<i>S. aureus</i>	10	10	10*	9	4	-	-	-	-	-
<i>S. epidermidis</i>	10	10	10	10	9	7	1*	-	-	-
<i>S. mutans</i>	10	10	10	10	10	10*	-	-	-	-
<i>C. albicans</i>	10	10	9*	1	-	-	-	-	-	-
<i>C. tropicalis</i>	10	10	7*	3	-	-	-	-	-	-
<i>C. glabrata</i>	10	10*	1	-	-	-	-	-	-	-

- concentração não efetiva; *CMM obtida em cepa-padrão (ATCC).

Para *S. aureus*, as concentrações de 100, 50 e 25 mg/mL foram efetivas para 100% das cepas, na concentração de 12,5 mg/mL foi constatada eliminação de 90% dos isolados e a 6,25 mg/mL houve eliminação de 40% das cepas. Em diluições inferiores a 6,25 mg/mL não foi observada atividade microbicida. Desta forma, a CMM₅₀ do extrato de barbatimão para *S. aureus* foi 12,5 mg/mL.

Em *S. epidermidis*, houve eliminação de todas as cepas nas concentrações de 100, 50, 25 e 12,5 mg/mL, na concentração de 6,25 mg/mL houve eliminação de 90% dos isolados e as concentrações de 3,13 e 1,56 mg/mL eliminaram 70 e 10% das cepas respectivamente. Em concentrações inferiores foi observado crescimento bacteriano. Assim, a CMM₅₀ do extrato de barbatimão para *S. epidermidis* foi 3,13 mg/mL.

Houve eliminação de 100% das cepas de *S. mutans* nas concentrações de 100, 50, 25, 12,5, 6,25 e 3,13 mg/mL, concentrações inferiores a 3,13 mg/mL não foram efetivas. Contudo, a CMM₅₀ do extrato de barbatimão para *S. mutans* foi 3,13 mg/mL.

Para *C. albicans*, as concentrações de 100 e 50 mg/mL foram efetivas para 100% das cepas, nas concentrações de 25 e 12,5 mg/mL ocorreram eliminação fúngica de 90 e 10% respectivamente, contudo, em concentrações inferiores não foi observada atividade microbicida. Desta forma, a CMM₅₀ do extrato de barbatimão para *C. albicans* foi 25 mg/mL.

Para *C. tropicalis*, houve eliminação de 100% das cepas nas concentrações de 100 e 50 mg/mL, de 70% na concentração de 25 mg/mL e de 30% a 12,5 mg/mL. Concentrações inferiores a 12,5 mg/mL não foram efetivas. Com isso, a CMM₅₀ do extrato de barbatimão para *C. tropicalis* foi 25 mg/mL.

Em cepas de *C. glabrata*, as concentrações de 100 e 50 mg/mL eliminaram todas as cepas e a concentração 25 mg/mL eliminou 10% dos isolados, contudo, em diluições inferiores não foi

observada atividade fungicida. Desta forma, a CMM₅₀ do extrato de barbatimão para *C. glabrata* foi 50 mg/mL.

5.2 Citotoxicidade dos extratos naturais com MTT

5.2.1 *Equisetum arvense* L. (cavalinha)

Na Tabela 09 seguem os valores percentuais de viabilidade celular, em comparação ao grupo controle (100% viável) das CMM do extrato natural de *E. arvense* L. (cavalinha) observadas nos microrganismos testados.

Tabela 09 - Viabilidade celular (%) das CMM (mg/mL) do extrato natural de *E. arvense* L. (cavalinha).

Amostra (n)	CMM (mg/mL)				
	50	25	12,5	6,25	3,13
1	42	43	63	54	80
2	43	43	63	54	84
3	44	44	68	55	84
4	44	44	68	57	84
5	44	44	70	57	85
6	45	45	70	58	86
7	47	45	70	58	87
8	48	45	71	59	88
9	53	45	72	61	90
10	54	45	76	61	90
11	56	45	77	63	91
12	56	47	81	63	93

Na Tabela 10 estão descritos valores médios, desvios-padrão e medianas obtidos com as amostras em relação à viabilidade celular das CMM do extrato natural de *E. arvense* L. (cavalinha).

Tabela 10 - Valores médios, desvios-padrão e medianas para viabilidade celular (%) das CMM (mg/mL) do extrato de *E. arvense* L. (cavalinha)

CMM (mg/mL)	n	Média (%)	Desvio-padrão	Mediana	Grupos Homogêneos*
Controle	12	100	0,00	100	A
50	12	48	5,29	46	B
25	12	45	1,08	45	B
12,5	12	71	5,31	70	C
6,25	12	58	3,17	58	D
3,13	12	87	3,71	87	E

*Letras diferentes indicam diferença estatisticamente significativa ($p \leq 0,05$).

Foi constatada diferença estatística significativa ($p < 0,0001$) entre os grupos pesquisados (controle e tratados).

Após 24 horas de exposição com as CMM do extrato natural de *E. arvense* L. (cavalinha) houve diminuição da viabilidade celular em todos os grupos tratados, em comparação ao grupo controle (100% viável) ($p > 0,01$). As reduções foram de 13% para o grupo tratado com 3,13 mg/mL, 29% para 12,5 mg/mL, 42% para 6,25 mg/mL, 52% para 50 mg/mL e 55% para 25 mg/mL.

A concentração com maior percentual de células sobreviventes foi a do grupo tratado com 3,13 mg/mL, apresentando em média 87% de viabilidade celular, sendo estatisticamente diferente dos demais grupos tratados ($p < 0,01$), bem como do grupo controle (100% viável) ($p < 0,01$).

O grupo tratado com 12,5 mg/mL do extrato natural de *E. arvense* L. (cavalinha) demonstrou em média 71% de viabilidade

celular, sendo estatisticamente diferente dos demais grupos tratados ($p<0,01$). Em comparação ao grupo controle houve redução significativa de sua viabilidade celular ($p<0,01$).

As amostras que receberam a concentração de 6,25 mg/mL apresentaram em média 58% de viabilidade celular, com diferença estatística significativa aos demais grupos testados ($p<0,01$), exibindo desta forma redução significativa de sua viabilidade celular em comparação ao grupo controle ($p<0,01$).

Os grupos que receberam as doses de 50 mg/mL e 25 mg/mL do extrato natural de *E. arvense* L. (cavalinha) foram estatisticamente semelhantes entre si ($p>0,05$) e apresentaram as menores taxas de sobrevivência celular, 48% e 45% respectivamente, diferindo significativamente dos demais grupos tratados ($p<0,01$). Em relação ao grupo controle demonstraram significativa redução em sua viabilidade celular ($p<0,01$).

5.2.2 *Glycyrrhiza glabra* L. (alcaçuz)

Os percentuais de viabilidade celular das CMM do extrato natural de *G. glabra* L. (alcaçuz) estão representados na Tabela 11 e valores médios, desvios-padrão e medianas destes percentuais seguem na Tabela 12.

Tabela 11 - Viabilidade celular (%) das CMM (mg/mL) do extrato natural de *G. glabra* L. (alcaçuz)

Amostra (n)	CMM (mg/mL)			
	100	50	25	12,5
1	66	48	50	56
2	70	49	50	56
3	77	50	51	57
4	79	50	51	58
5	79	51	52	58
6	79	52	52	59
7	80	52	52	61
8	81	52	53	61
9	83	54	53	61
10	83	55	53	63
11	86	57	54	65
12	88	57	55	67

Tabela 12 - Valores médios, desvios-padrão e medianas para viabilidade celular (%) das CMM (mg/mL) do extrato de *G. glabra* L. (alcaçuz)

CMM (mg/mL)	n	Média (%)	Desvio- padrão	Mediana	Grupos Homogêneos*
Controle	12	100	0,00	100	A
100	12	79	6,18	80	B
50	12	52	2,96	52	C
25	12	52	1,53	52	C
12,5	12	60	2,51	60	D

*Letras diferentes indicam diferença estatisticamente significativa ($p \leq 0,05$).

Foi constatada diferença significativa ($p < 0,0001$) entre os grupos tratados com CMM do extrato natural de *G. glabra* L. (alcaçuz) e grupo controle.

Após 24 horas de exposição, foi observada redução da viabilidade celular nos grupos que receberam tratamento com as CMM do extrato natural de *G. glabra* L. (alcaçuz) em comparação ao grupo controle ($p>0,01$). O grupo tratado com 100 mg/mL sofreu redução de 21% em sua viabilidade, o grupo de 12,5 mg/mL teve redução de 40% e os grupos de 50 e 25 mg/mL tiveram redução de 48% cada um.

O grupo tratado com 100 mg/mL do extrato natural de *G. glabra* L. (alcaçuz) apresentou em média 79% de células sobreviventes, demonstrou ser a concentração mais viável dentre as testadas, uma vez que apresentou diferença estatística significativa aos demais grupos tratados ($p<0,01$). Em comparação ao grupo controle foi observada redução significativa de sua viabilidade celular ($p<0,01$).

As amostras que receberam tratamento com 12,5 mg/mL do extrato natural de *G. glabra* L. (alcaçuz), tiveram em média 60% de células sobreviventes, exibindo redução significativa de sua viabilidade em comparação ao grupo controle ($p<0,01$), além de diferirem estatisticamente dos demais grupos tratados ($p<0,01$).

Os grupos tratados com 50 e 25 mg/mL foram estatisticamente semelhantes entre si ($p>0,05$), apresentando reduções significativas em sua viabilidade celular em relação ao grupo controle ($p<0,01$). Estes grupos exibiram também menores índices de viabilidade celular, ou seja, 52% em cada grupo, em comparação aos grupos tratados com 100 ($p<0,01$) e 12,5 mg/mL ($p<0,01$) que apresentaram 79 e 60% de viabilidade celular, respectivamente.

5.2.3 *Punica granatum* L. (romã)

Na Tabela 13 estão representados os resultados da viabilidade celular das CMM do extrato natural de *P. granatum* L. (romã), em comparação ao grupo controle.

Tabela 13 - Viabilidade celular (%) das CMM (mg/mL) do extrato natural de *P. granatum* L. (romã)

Amostra (n)	CMM (mg/mL)				
	50	25	12,5	6,25	3,13
1	70	51	50	93	59
2	73	52	51	95	59
3	73	52	53	95	60
4	74	53	56	95	60
5	74	53	56	96	60
6	76	54	57	98	60
7	76	56	58	99	61
8	77	60	59	99	61
9	77	61	60	100	61
10	79	63	60	101	62
11	79	64	60	102	62
12	81	65	61	106	63

Na Tabela 14 seguem valores médios, desvios-padrão e medianas para viabilidade celular das CMM do extrato natural de *P. granatum* L. (romã).

Tabela 14 - Valores médios, desvios-padrão e medianas para viabilidade celular (%) das CMM (mg/mL) do extrato de *P. granatum* L. (romã)

CMM (mg/mL)	n	Média (%)	Desvio-padrão	Mediana	Grupos Homogêneos*
Controle	12	100	0,00	100	A
50	12	76	3,10	76	B
25	12	57	5,24	55	C
12,5	12	57	3,70	58	C
6,25	12	98	3,70	99	A
3,13	12	61	1,23	61	C

*Letras diferentes indicam diferença estatisticamente significativa ($p \leq 0,05$).

Houve diferença estatística significativa ($p < 0,0001$) entre os grupos controle e tratados com CMM do extrato natural de *P. granatum* L. (romã).

Após 24 horas de contato com as CMM do extrato natural de *P. granatum* L. (romã), foi observada redução da viabilidade celular dos grupos tratados em comparação ao grupo controle ($p > 0,01$). Estas reduções na viabilidade celular foram de 24% para o grupo de 50 mg/mL, 43% nos grupos de 25 e 12,5 mg/mL, 2% no grupo de 6,25 mg/mL e 39% no grupo de 3,13 mg/mL.

O grupo tratado com a concentração de 6,25 mg/mL do extrato natural de *P. granatum* L. (romã) obteve o percentual de células sobreviventes de 98%, sendo estatisticamente semelhante ao grupo controle ($p > 0,05$), demonstrando ser a concentração mais viável dentre as testadas. Este grupo exibiu diferença estatística significativa aos grupos tratados com 50 mg/mL ($p > 0,01$), 25 mg/mL ($p > 0,01$), 12,5 mg/mL ($p > 0,01$) e 3,13 mg/mL ($p > 0,01$).

O grupo que recebeu tratamento com a concentração de 50 mg/mL demonstrou viabilidade celular de 76%, diferindo significativamente dos demais grupos ($p > 0,01$).

As amostradas tratadas com 25, 12,5 e 3,13 mg/mL foram semelhantes entre si ($p>0,05$), apresentando em média 57% de viabilidade celular para os dois primeiros grupos e 61% para o grupo de 3,13 mg/mL. Estes três grupos apresentaram diminuição significativa em sua viabilidade celular quando comparados ao grupo controle ($p<0,01$).

5.2.4 *Stryphnodendron barbatimam* Mart. (barbatimão)

Estão apresentados na Tabela 15 os valores referentes à viabilidade celular das CMM do extrato natural de *S. barbatimam* Mart. (barbatimão) em relação ao grupo controle.

Tabela 15 - Viabilidade celular (%) das CMM (mg/mL) do extrato natural de *S. barbatimam* Mart. (barbatimão)

Amostra (n)	CMM (mg/mL)					
	50	25	12,5	6,25	3,13	1,56
1	76	63	57	90	65	59
2	82	66	58	96	65	61
3	83	66	60	97	67	61
4	84	66	61	99	68	68
5	85	67	65	100	68	71
6	86	69	66	101	70	71
7	87	70	66	108	73	72
8	88	74	67	108	75	72
9	88	75	67	115	75	74
10	89	75	67	117	76	74
11	89	76	72	126	83	77
12	91	78	72	130	83	79

Na Tabela 16, seguem os valores médios $\pm$ desvios-padrão e medianas para viabilidade celular das CMM (mg/mL) do extrato de *S. barbatimam* Mart. (barbatimão).

Tabela 16 - Valores médios, desvios-padrão e medianas para viabilidade celular (%) das CMM (mg/mL) do extrato de *S. barbatimam* Mart. (barbatimão)

CMM (mg/mL)	n	Média (%)	Desvio-padrão	Mediana	Grupos Homogêneos*
Controle	12	100	0,00	100	A
50	12	86	4,05	86	B
25	12	70	4,96	70	C
12,5	12	65	4,91	66	C
6,25	12	107	12,48	104	A
3,13	12	72	6,27	72	C
1,56	12	70	6,46	72	C

*Letras diferentes indicam diferença estatisticamente significativa ($p \leq 0,05$).

Houve diferença estatística significativa ($p < 0,0001$) entre os grupos tratados com concentrações microbidas do extrato natural de *S. barbatimam* Mart. (barbatimão).

Após 24 horas de exposição, os grupos tratados com CMM do extrato natural de *S. barbatimam* Mart. (barbatimão) apresentaram redução em sua viabilidade celular em comparação ao grupo controle ($p < 0,01$), exceto no grupo tratado com 6,25 mg/mL que apresentou aumento de 7% em sua viabilidade ($p > 0,05$). Em média, as reduções foram de 14% para o grupo tratado com 50 mg/mL, 28% para 3,13 mg/mL, 30% para 25 e 1,56 mg/mL, 35% para 12,5 mg/mL.

O grupo tratado com 6,25 mg/mL apresentou em média viabilidade celular de 107%. Este grupo foi estatisticamente semelhante ao grupo controle ($p > 0,05$) demonstrando, desta forma, ser o grupo com o

maior índice de viabilidade celular, e diferente significativamente dos demais grupos tratados ($p<0,01$).

O grupo tratado com 50 mg/mL demonstrou viabilidade celular de 86%, exibindo redução significativa de sua viabilidade, em comparação ao grupo controle ($p<0,01$). Este grupo experimental não apresentou semelhança estatística em relação aos demais grupos tratados ($p<0,01$).

As amostras que receberam tratamento com 25, 12,5, 3,13 mg/mL e 1,56 mg/mL foram estatisticamente semelhantes entre si ($p>0,05$), apresentando em média 70, 65, 72 e 70% de viabilidade celular, respectivamente. Contudo, estes grupos exibiram significativa redução em sua viabilidade celular em comparação ao grupo controle ($p<0,01$).

5.3 Citotoxicidade dos extratos naturais pela produção de citocinas IL-1 β e TNF- α

5.3.1 Produção de IL-1 β

Na Tabela 17 estão apresentados os resultados da produção de IL-1 β (pg/mL) nos sobrenadantes de culturas de macrófagos de camundongo após exposição de 24 horas às CMM de 100 mg/mL para alcaçuz (*G. glabra* L.) e de 50 mg/mL para barbatimão (*S. barbatimam* Mart.), cavalinha (*E. arvense* L.) e romã (*P. granatum* L.) e na Tabela 18 seguem os valores médios $\pm$ desvios-padrão e medianas destes resultados obtidos.

Tabela 17 - Produção de IL-1 β (pg/mL) por macrófagos de camundongo após exposição de 24 horas às concentrações dos extratos naturais

Amostra (n)	Grupos				
	Controle	ALC	BAR	CAV	ROM
1	0,00	0,00	2,08	0,00	5,62
2	0,00	0,00	2,72	0,00	6,59
3	0,00	0,00	2,72	0,00	6,91
4	0,47	1,11	3,04	0,00	6,91
5	1,11	2,08	3,04	0,00	7,23
6	1,76	2,08	3,68	0,79	7,23
7	1,76	2,08	4,01	1,43	8,20
8	2,40	2,40	4,33	1,76	8,20
9	3,36	3,04	4,65	2,40	8,53
10	4,33	3,04	4,65	2,72	8,85
11	4,97	3,68	6,26	3,36	9,17
12	6,26	4,33	6,59	3,36	9,17

ALC (alcaçuz, *G. glabra* L.); BAR (barbatimão, *S. barbatimam* Mart.); CAV (cavalinha, *E. arvense* L.); ROM (romã, *P. granatum* L.).

Tabela 18 - Valores médios, desvios-padrão e medianas obtidos na produção de IL-1 β (pg/mL) por macrófagos após 24 horas de exposição às concentrações dos extratos naturais

CMM (mg/mL)	n	Média (pg/mL)	Desvio- padrão	Mediana	Grupos Homogêneos*
Controle	12	2,20	2,11	1,76	A
ALC	12	1,99	1,46	2,08	A
BAR	12	3,98	1,40	3,84	B
CAV	12	1,32	1,37	1,11	A
ROM	12	7,72	1,13	7,72	C

ALC (alcaçuz, *G. glabra* L.); BAR (barbatimão, *S. barbatimam* Mart.); CAV (cavalinha, *E. arvense* L.); ROM (romã, *P. granatum* L.). *Letras diferentes indicam diferença estatisticamente significativa ($p \leq 0,05$).

Os grupos tratados com CMM do extrato natural de alcaçuz (*G. glabra*) e cavalinha (*E. arvense* L.) produziram em média 1,99 e 1,32 pg/mL de IL-1 β respectivamente. As concentrações encontradas nestes dois grupos foram inferiores aquelas exibidas pelo grupo controle (2,20 pg/mL), porém, sem diferença estatística significativa ($p>0,05$).

O grupo tratado com a CMM do extrato natural de romã (*P. granatum* L.) exibiu em média a maior produção de IL-1 β (7,72 pg/mL) em comparação aos demais grupos tratados e também ao grupo controle ($p<0,01$).

O grupo que recebeu tratamento com a CMM do extrato natural de barbatimão (*S. barbatimam* Mart.) produziu em média 3,98 pg/mL de IL-1 β , desta forma, apresentou a segunda maior concentração desta citocina, em comparação ao grupo controle ($p<0,05$) e aos grupos tratados com extrato natural de alcaçuz (*G. glabra* L.) ($p<0,05$), cavalinha (*E. arvense* L.) ($p<0,01$) e romã (*P. granatum* L.) ($p<0,01$).

5.3.2 Produção de TNF- α

Na Tabela 19 estão demonstrados os valores obtidos na produção de TNF- α (pg/mL) por macrófagos após o período de 24 horas de contato com concentrações de 100 mg/mL do extrato de alcaçuz (*G. glabra* L.) e de 50 mg/mL dos extratos de barbatimão (*S. barbatimam* Mart.), cavalinha (*E. arvense* L.) e romã (*P. granatum* L.) e na Tabela 20 seguem os valores médios $\pm$ desvios-padrão e medianas destes resultados.

Tabela 19 - Produção de TNF- α (pg/mL) por macrófagos de camundongo após exposição de 24 horas às concentrações dos extratos naturais

Amostra (n)	Grupos				
	Controle	ALC	BAR	CAV	ROM
1	28,95	2,82	0,00	0,00	0,00
2	31,66	3,32	0,00	0,00	0,00
3	32,26	3,83	0,00	0,00	0,00
4	32,87	4,33	0,00	0,00	0,00
5	35,89	4,58	0,00	0,00	0,00
6	40,45	4,58	0,00	0,00	0,00
7	40,75	4,58	0,00	0,00	0,00
8	43,19	5,08	0,00	0,00	0,00
9	47,48	5,59	0,00	0,00	0,00
10	51,17	5,84	0,00	0,00	0,00
11	57,98	6,09	0,00	0,00	0,00
12	60,79	8,37	10,15	9,90	0,00

ALC (alcaçuz, *G. glabra* L.); BAR (barbatimão, *S. barbatimam* Mart.); CAV (cavalinha, *E. arvense* L.); ROM (romã, *P. granatum* L.).

Tabela 20 - Valores médios, desvios-padrão e medianas obtidos na produção de TNF- α (pg/mL) por macrófagos após 24 horas de exposição às concentrações dos extratos naturais

CMM (mg/mL)	n	Média (pg/mL)	Desvio- padrão	Mediana	Grupos Homogêneos*
Controle	12	41,96	10,53	40,60	A
ALC	12	4,92	1,46	4,58	B
BAR	12	0,85	2,93	0,00	B
CAV	12	0,83	2,86	0,00	B
ROM	12	0,00	0,00	0,00	B

ALC (alcaçuz, *G. glabra* L.); BAR (barbatimão, *S. barbatimam* Mart.); CAV (cavalinha, *E. arvense* L.); ROM (romã, *P. granatum* L.). *Letras diferentes indicam diferença estatisticamente significativa ($p \leq 0,05$).

Houve diferença estatística significativa ($p < 0,0001$) entre os grupos experimentais.

Observou-se que o grupo controle produziu em média 41,96 pg/mL de TNF- α e as amostras tratadas com CMM dos extratos naturais de *E. arvense* L.(cavalinha), *G. glabra* L. (alcaçuz), *P. granatum* L. (romã) e *S. barbatimam* Mart. (barbatimão) apresentaram em média menores concentrações desta citocina ($p < 0,01$). Desta forma, todos os grupos tratados foram significativamente diferentes do grupo controle ($p < 0,01$), no entanto, semelhantes entre si ($p > 0,05$).

O extrato natural de romã (*P. granatum* L) inibiu completamente a produção de TNF- α . Evento ocorrido semelhantemente nos grupos tratados com extrato natural de cavalinha (*E. arvense* L.), que apresentou em média baixa produção da citocina, 0,83 pg/mL, e barbatimão (*S. barbatimam* Mart.) com produção de 0,85 pg/mL de TNF- α .

As amostras tratadas com o extrato natural de alcaçuz (*G. glabra* L.) apresentaram em média a maior produção de TNF- α , 4,92 pg/mL, mesmo assim, juntamente com os demais extratos naturais, também demonstrou menor produção da citocina, quando comparado ao grupo controle ($p < 0,01$).

6 DISCUSSÃO

6.1 Atividade antimicrobiana de extratos naturais

6.1.1 Metodologia

Através do teste de microdiluição em caldo foi avaliada a atividade antimicrobiana dos extratos naturais. Este teste é comumente utilizado para determinar a susceptibilidade de microrganismos a agentes antimicrobianos, podendo constatar a menor concentração de tal produto com capacidade de inibição do crescimento microbiano, chamada de Concentração Inibitória Mínima (CIM) (Tanigushi, Kubo, 1993). Trata-se de um método de fácil execução, econômico e com resultados rápidos (NCCLS, 2002). Segundo Hadacek e Greger (2000) este método teve maior sensibilidade a agentes antimicrobianos que o método de difusão em ágar, devido ao contato direto entre agente antimicrobiano, meio de cultura e microrganismo.

Diversos estudos tem sido conduzidos em relação à verificação da atividade antimicrobiana de produtos naturais como extratos vegetais e óleos essenciais de plantas, além de materiais oriundos de atividade animal, como é o caso da própolis, entre outros materiais com possível atividade antimicrobiana, além de investigações científicas utilizando-se apenas o princípio ativo de plantas também tem sido conduzidas por pesquisadores em inúmeros países (Gupta et al., 2008; Bialonska et al., 2009; Graebin et al., 2010; Hayouni et al., 2011; Pereira et al., 2011;). Em ambos os casos, o objetivo principal

destes estudos foi a busca por métodos alternativos de controle de microrganismos que possam causar infecções em seres humanos.

No presente estudo foi verificada a atividade antimicrobiana dos extratos naturais de *E. arvense* L. (cavalinha), *G. glabra* L. (alcaçuz), *P. granatum* L. (romã) e *S. barbatimam* Mart. (barbatimão). A seleção destes vegetais para os testes foi feita com base em achados na literatura que comprovaram efetividade microbicida dos extratos (Radulovic et al., 2006; Gupta et al., 2008; Al-Zoreky, 2009; Pereira et al., 2011). Contudo, não foram encontrados resultados em cepas isoladas de pacientes, por isso buscou-se analisar os efeitos destes produtos naturais não somente em cepas-padrão, mas também em cepas clínicas, devido à variabilidade destes organismos, pertencentes à mesma espécie, frente ao mesmo tratamento com agentes naturais. No presente estudo foi comprovada diferenças em relação à sensibilidade aos extratos naturais pelas cepas testadas (clínicas e ATCC). Com isso, a ação destes extratos foi testada em cepas microbianas de *S. aureus*, *S. epidermidis*, *S. mutans*, *C. albicans*, *C. tropicalis* e *C. glabrata*, uma vez que tais espécies estão associadas às infecções na cavidade oral.

No presente estudo, os extratos apresentaram efetividade sob todas as cepas testadas, entretanto, os microrganismos demonstraram diferenças de comportamento em relação à sensibilidade quando expostos a diferentes concentrações destes produtos naturais. Segundo NCCLS (2003) o efeito da concentração do extrato natural nos microrganismos pode ser inativado por diversas enzimas, bem como pela alteração da absorção ou efluxo destes agentes, além de alterações do sítio-alvo destes produtos.

6.1.2 Resultados

Neste estudo, as CMM do extrato natural de *E. arvense* L. (cavalinha) ocuparam o intervalo entre 100 e 3,13 mg/mL. Observou-se que a concentração de 50 mg/mL foi a CMM que apresentou a melhor efetividade para as cepas de *S. aureus*, *S. epidermidis*, *C. albicans*, *C. tropicalis* e *C. glabrata*, com capacidade de eliminação de todas as cepas. Em *S. mutans*, a CMM de 25 mg/mL foi capaz de eliminar todas as cepas desta espécie, com este resultado observou-se que esta espécie foi mais sensível ao extrato natural de *E. arvense* L. (cavalinha) que as demais testadas. Em relação às cepas ATCC, a mais sensível foi a da espécie de *S. mutans*, uma vez que, foi eliminada com 3,13 mg/mL, as demais apresentaram eliminação com 25 mg/mL (*S. epidermidis* e *C. tropicalis*) e 50 mg/mL (*S. aureus*, *C. albicans* e *C. glabrata*).

Estes resultados concordam com o estudo de Radulovic et al. (2006) que verificaram a atividade antimicrobiana do óleo essencial de *E. arvense* L. e puderam notar a alta capacidade de eliminação de bactérias e fungos, pelo método de disco-difusão. O óleo essencial atuou sobre bactérias Gram-negativas, como *Salmonella enteritidis* e *Klebsiella pneumoniae* formando respectivamente zonas de inibição de 35 e 37 mm, contra a bactéria Gram-positiva *S. aureus* (28 mm) e também contra os fungos *C. albicans* (23 mm) e *Aspergillus niger* (25 mm). Segundo os autores, a atividade antimicrobiana de *E. arvense* L. está atribuída à presença de diversas substâncias, dentre as quais se destacam o monoterpeno fenólico timol, também descrito por Pattnaik et al. (1997) e Tepe et al. (2004). Milovanovic et al. (2007) também constataram a sensibilidade de microrganismos ao extrato hidroalcoólico de *Equisetum* spp. pelo método de disco-difusão. Segundo os autores, o extrato de *Equisetum* spp. apresentou maior atividade antifúngica, contra *C. albicans* e *A. niger*, que

nistatina, e também comprovaram que *C. albicans* foi mais sensível a *E. arvense* L. que *S. aureus*, porém no nosso estudo houve sensibilidade semelhante em relação a CMM capaz de eliminar 100% das cepas.

As CMM do extrato natural de *G. glabra* L. (alcaçuz) ficaram no intervalo de 100 a 12,5 mg/mL. Para eliminação de todas as cepas de *S. aureus*, *S. epidermidis* e *S. mutans* foi necessário a utilização de 100 mg/mL do extrato, entretanto, para que 100% das cepas de *C. albicans*, *C. tropicalis* e *C. glabrata* fossem eliminadas, a concentração de 50 mg/mL foi suficiente. Estes resultados mostram que as cepas de leveduras foram mais sensíveis ao extrato natural C (alcaçuz) que as bactérias. As cepas ATCC também apresentaram sensibilidades diferentes: a 100 mg/mL (*S. aureus*), a 50 mg/mL (*S. epidermidis*, *C. albicans*, *C. tropicalis* e *C. glabrata*) e a 12,5 mg/mL (*S. mutans*).

Neste estudo foi comprovada atividade antimicrobiana do extrato de alcaçuz (*G. glabra* L.) sob cepas bacterianas e fúngicas, como descrito por Gupta et al. (2007) e Pellati et al. (2009). Segundo Gupta et al. (2007), compostos fitoquímicos como glabridina e hispaglabridina B são os responsáveis pela atividade antimicrobiana do extrato. Estes autores verificaram a atividade antimicobacteriana do extrato etanólico de *G. glabra* L. (alcaçuz) a 500 µg/mL contra cepas de *Mycobacterium tuberculosis*, da glabridina (29,16 µg/mL) e de outras frações etanólicas do extrato. Constataram também atividade antibacteriana da glabridina em *S. aureus* (3,9 µg/mL), *S. epidermidis* (7,5 µg/mL) e *S. mutans* (7,5 µg/mL), como foi demonstrado no nosso estudo pelo extrato natural *G. glabra* L. (alcaçuz) sob estas espécies. Pellati et al. (2009) também constataram ação antifúngica de um composto de *G. glabra* L., o ácido 18β-glicirretínico, contra cepas de *C. albicans* isoladas de exsudato vaginal de pacientes com candidose vulvovaginal. Os autores comprovaram que o ácido exibiu elevada inibição do crescimento das cepas, sugerindo ser uma alternativa para tratamento tópico deste tipo de candidose. Fukai et al. (2002) verificaram

atividade da glabridina contra *Helicobacter pylori* e Wittschier et al. (2009) constataram que o extrato aquoso de *G. glabra* L. (alcaçuz) a 1 mg/mL inibiu significativamente a adesão desta bactéria em tecido estomacal humano, além de demonstrarem elevada atividade antiadesiva contra *Porphyromonas gingivalis*.

As CMM do extrato natural de *P. granatum* L. (romã) oscilaram entre 100 e 3,13 mg/mL, no entanto, para que todas as cepas das espécies testadas fossem eliminadas foi necessário o uso da CMM de 50 mg/mL. Cepas de *S. mutans* demonstraram ser mais sensíveis ao extrato, uma vez que, utilizando, no mínimo, a CMM de 12,5 mg/mL houve eliminação total das cepas. Para cepas de *S. aureus* e *S. epidermidis* a concentração de 25 mg/mL foi a menor CMM que causou morte de todas as cepas. As cepas de *Candida* spp. demonstraram menor sensibilidade ao extrato, pois necessitaram da concentração de 50 mg/mL para que ocorresse eliminação total dos isolados. Em relação às cepas ATCC, a de *S. mutans* foi a mais sensível, com CMM de 3,13 mg/mL, seguida pela ATCC de *S. epidermidis* (12,5 mg/mL), *S. aureus*, *C. tropicalis* e *C. glabrata* (25 mg/mL) e pela menos sensível de *C. albicans* (50 mg/mL).

Os resultados deste estudo demonstraram que houve atividade antimicrobiana do extrato natural de *P. granatum* L. (romã), concordando com estudos que comprovaram a efetividade de *P. granatum* L. e seus constituintes em cepas microbianas, tais como demonstrados por: a) Al-zorey (2009), que verificou a atividade antimicrobiana da casca da fruta da romã (*P. granatum* L.) e determinou a concentração de 2 mg/mL como sendo inibitória para *S. aureus* e também para MRSA (*Staphylococcus aureus* metilicina resistente); b) Braga et al. (2005), que constataram que o extrato de *P. granatum* L. (romã) contribuiu para a inibição do crescimento de *S. aureus* e também da produção de enterotoxinas por MRSA, uma vez que para os autores algumas cepas de MRSA apresentam genes para diversas enterotoxinas;

c) Hayouni et al. (2011), que desenvolveram uma pomada à base do extrato hidroalcoólico de sementes de romã com atividade antimicrobiana contra diversos microrganismos dentre os quais estão *S. aureus* e *C. albicans*. Segundo Voravuthikunchai et al. (2005), a atividade bactericida de *P. granatum* L. está associada à presença do composto fenólico tanino. Para Machado et al. (2003) e Naz et al. (2007), o mecanismo pelo qual este composto fenólico afeta microrganismos está na reação com um grupo específico presentes em proteínas (sulfidril). Machado et al. (2002) atribuíram ao composto punicalagina a atividade antimicrobiana de *P. granatum* L., quando testaram em cepas de MRSA isoladas de pacientes hospitalizados, verificando que a concentração de 61,5 µg/mL foi inibitória para aquelas cepas.

As CMM do extrato natural de *S. barbatimam* Mart. (barbatimão) ficaram entre 100 e 1,56 mg/mL. As cepas de *S. mutans* exibiram maior sensibilidade ao extrato, sendo eliminadas com a CMM de 3,13 mg/mL. Para que ocorresse eliminação de todas as cepas de *S. epidermidis* foi necessário a utilização da concentração de 12,5 mg/mL, em cepas de *S. aureus* a CMM de 25 mg/mL foi eficiente. As cepas fúngicas demonstraram menor sensibilidade ao extrato, necessitando da CMM de 50 mg/mL para se obter eliminação total das cepas. Em relação às cepas ATCC, a da espécie *S. epidermidis* foi a mais sensível, sendo eliminada com a CMM de 1,56 mg/mL, a da espécie *S. mutans* foi eliminada a 3,13 mg/mL, as das espécies de *S. aureus*, *C. albicans*, *C. tropicalis* foi a 25 mg/mL e a da espécie de *C. albicans* foi a 50 mg/mL.

Através desses resultados observou-se efetiva atividade antimicrobiana do extrato de *S. barbatimam* Mart. (barbatimão) sob as cepas de bactérias e leveduras testadas, de acordo com os estudos de Pereira et al. (2011) que verificaram a atividade antimicrobiana *in vitro* de extratos de plantas medicinais brasileiras, inclusive barbatimão (*Stryphnodendron* spp.), sob patógenos da cavidade oral, tais como, *S. aureus*, *S. mutans*, *C. albicans* e *A. actinomycetemcomitans*, através

do teste de microdiluição em caldo. Os autores constataram que *S. mutans* apresentaram maior sensibilidade ao extrato, com CIM de 1 mg/mL e *C. albicans* a menor sensibilidade, com CIM de 4,25 mg/mL, semelhantemente ao presente estudo que apresentou as cepas de *S. mutans* como sendo as mais sensíveis ao extrato de barbatimão e *C. albicans* como as menos sensíveis, *A. actinomycetemcomitans* obteve CIM de 4 mg/mL.

No estudo de Souza et al. (2007) sobre atividade antimicrobiana do extrato seco de barbatimão (*Stryphnodendron* spp.) foi constatado o perfil bactericida do produto natural, pelo teste de microdiluição em caldo, sob *S. aureus* e *S. epidermidis*, apresentando como CMM 50 mg/mL e 75 mg/mL, respectivamente. No presente estudo, foi encontrado valores menores de CMM que eliminaram 100% das cepas, sendo 25 mg/mL para *S. aureus* e 12,5 mg/mL para *S. epidermidis*. Souza et al. (2007) também produziram e utilizaram um sabonete líquido contendo em sua fórmula 100 mg/mL de extrato seco da casca de barbatimão (*Stryphnodendron* spp.) o que resultou em inibição de 93,33% para *S. aureus* e 86,66% para *S. epidermidis*, comprovando atividade antisséptica do extrato de barbatimão (*Stryphnodendron* spp.).

Ishida et al. (2006) estudando a influência do componente tanino do barbatimão (*Stryphnodendron* spp.) sob *C. albicans* através do método de microdiluição em caldo, observaram que concentrações fungicidas variaram entre 31,25 mg/mL e 1000 mg/mL, concluindo que tal componente foi responsável por afetar a integridade da parede celular da levedura, diminuir a capacidade de aderência em células eucariontes, inibir a formação de tubo germinativo e estimular a fagocitose por macrófagos. No presente estudo houve eliminação de cepas de *C. albicans* entre as CMM de 12,5 e 50 mg/mL com utilização do extrato natural de barbatimão.

Sumarizando, se fosse necessário a utilização de apenas uma concentração de cada extrato capaz de eliminar todas as cepas

bacterianas e fúngicas testadas neste estudo seria de 50 mg/mL para *E. arvense* L. (cavalinha), *P. granatum* L. (romã) e *S. barbatimam* Mart. (barbatimão) e de 100 mg/mL para *G. glabra* L. (alcaçuz).

6.2 Citotoxicidade dos extratos naturais

6.2.1 Metodologia

Após constatação das CMM dos extratos naturais de *E. arvense* L. (cavalinha), *G. glabra* L. (alcaçuz), *P. granatum* L. (romã) e *S. barbatimam* Mart. (barbatimão) foi verificada a ação de tais produtos naturais em culturas de macrófagos (RAW 264.7). Esta linhagem celular é frequentemente utilizada em estudos que avaliam a citotoxicidade de produtos após período de exposição a estas substâncias. RAW 264.7 também é bastante utilizada nos estudos que visam quantificar a produção de citocinas e outros mediadores ligados à resposta inflamatória (Xu et al., 2007; Yang et al., 2009; Koh et al., 2010).

Para o teste de citotoxicidade no presente estudo foi utilizada a quantidade de 8×10^3 células/poço, uma vez que, em testes preliminares esta foi a quantidade mais satisfatória de células viáveis para realização do teste definitivo.

Foi analisada a viabilidade celular após exposição às CMM dos quatro extratos naturais – determinadas no teste de atividade antimicrobiana – pelo método de redução do MTT em formazina, devido a sua facilidade operacional, agilidade na obtenção dos resultados e por verificar o percentual de células viáveis, em relação a sua atividade metabólica após período de exposição às concentrações dos extratos naturais. Esta atividade metabólica ocorre nas mitocôndrias de células

viáveis, sob ação de desidrogenases mitocondriais que degradam o anel tetrazólio do MTT, produzindo cristais insolúveis de formazina (Mossman, 1983). Este método é comumente utilizado para verificação da citotoxicidade de produtos (Schmalz et al., 2002; Kim et al., 2008; Yan et al., 2009; Yang et al., 2009; Yoon et al., 2009; Guerrero et al., 2011).

O período de exposição citado anteriormente se refere a 24 horas de contato célula – extrato, o mesmo descrito por Yan et al. (2008) e Yang et al. (2009), além de ter sido o mesmo período de tempo em que os extratos ficaram em contato com as cepas microbianas. Após este período, foi constatada redução de viabilidade nas culturas celulares e em apenas um caso específico foi verificado aumento de 7%, na concentração de 6,25 mg/mL do extrato natural de *S. barbatimam* Mart. (barbatimão).

Os dados obtidos em espectrofotometria, diretamente proporcionais à concentração de células sobreviventes, foram convertidos em percentuais de viabilidade celular, em comparação ao grupo controle considerado 100% viável (Ferreira et al, 2010), desta forma, os dados foram apresentados em relação aos percentuais de células sobreviventes após o período de exposição.

6.2.2 Resultados

Esperava-se que as CMM de todos os extratos naturais, capazes de eliminar 100% das cepas microbianas, apresentassem viabilidade celular com percentuais próximos ao grupo controle ou no mínimo acima de 50% da viabilidade celular.

Nos grupos celulares tratados com diferentes concentrações dos extratos naturais foi observado diferenças no

percentual de células sobreviventes. Esperava-se também que nos grupos tratados com concentrações mais baixas fossem obtidas maiores percentuais de células viáveis e nos grupos tratados com concentrações mais elevadas o número de células sobreviventes fosse reduzido, no entanto, o que se percebeu foi uma variedade de situações, onde concentrações mais baixas tiveram menores percentuais de células sobreviventes, concentrações mais elevadas apresentaram maiores percentuais de viabilidade celular e concentrações entre os dois extremos ora apresentaram maior viabilidade ora menor viabilidade. Contudo, constatou-se redução em praticamente todos os grupos tratados com CMM, exceto naquele tratado com 6,25 mg/mL do extrato natural de *S. barbatimam* Mart. (barbatimão) após 24 horas de exposição. Estas observações estão de acordo com o estudo de Ferreira et al. (2010) que verificaram a viabilidade celular de antimicrobianos, como cloridrato de ciprofloxacina, cloridrato de clindamicina e metronidazol, utilizados na terapia endodôntica, através do método MTT. Os autores observaram que após 24 horas de contato tais produtos apresentaram citotoxicidade dose-dependente, portanto, redução da viabilidade celular das culturas.

Em relação à viabilidade celular do extrato natural de *E. arvense* L. (cavalinha) observou-se que a concentração com maior percentual de células sobreviventes foi a mais diluída, isto é, 3,13 mg/mL, apresentando em média 87% de viabilidade celular, contudo esta concentração foi efetiva para apenas 30% das cepas de *S. mutans* e nenhuma outra espécie. Testando a CMM mais efetiva contra todas as cepas microbianas (50 mg/mL) observou-se que esta apresentou o menor percentual de células sobreviventes (48%). Desta forma, verificou-se que a concentração deste extrato mais efetiva contra as cepas microbianas foi também citotóxica. Semelhantemente foi observado no estudo de Yoon et al. (2009) que o grupo tratado com a maior concentração do extrato de *Scutellaria baicalensis* também apresentou maior citotoxicidade. Os autores além de verificar a citotoxicidade do extrato

aquoso de *Scutellaria baicalensis* em culturas de RAW 264.7, verificaram também os efeitos anti-inflamatórios deste extrato através da indução à produção de citocinas por LPS. Eles testaram a citotoxicidade das concentrações de 25, 50, 100, 200 e 400 µg/mL do extrato de *S. baicalensis*, através do método MTT, e constataram que houve redução de viabilidade apenas a 400 µg/mL.

O extrato natural de *G. glabra* L. (alcaçuz) em sua CMM mais efetiva, 100 mg/mL, apresentou em média o maior percentual de células sobreviventes, com 79% de viabilidade celular, em comparação aos outros grupos tratados. Com isso, observou-se que a CMM do extrato de alcaçuz com melhor efetividade contra todas as cepas microbianas apresentou menor efeito citotóxico. Isso ocorreu semelhantemente no estudo de Hsiung e Kadir (2011), em culturas de células Vero (linhagem celular de rim de macaco verde africano, *Cercopithecus aethiops*), quando os autores testaram a citotoxicidade da fração acetato-etílica do extrato natural de *Leea indica*, onde constataram que a concentração mais elevada foi semelhante ao grupo controle (100% viável), uma vez que testaram as concentrações de 10, 40, 60, 80, 100, 150 e 200 µg/mL.

Quanto ao extrato natural de *P. granatum* L. (romã) foi observado que a CMM de 50 mg/mL, mais efetiva contra todas as amostras microbianas, apresentou em média viabilidade celular de 76%. O grupo tratado com a CMM de 6,25 mg/mL apresentou o maior percentual de células sobreviventes, 98%, contudo, esta CMM foi capaz de eliminar 90% das cepas de *S. mutans*, 50% de *S. epidermidis* e 20% de *S. aureus*. Os resultados deste estudo demonstraram baixa redução da viabilidade celular do grupo tratado com a CMM de 50 mg/mL, ou seja, 24%. Em contrapartida, Oliveira et al. (2009) verificaram que o extrato de *Punica granatum* L. (romã) reduziu a viabilidade de linhagens K-562 (linhagem leucêmica) e TAE (Tumor Ascítico de Ehrlich) em 50%. Segundo os autores, em testes com cobaias (camundongos portadores de TAE) a administração do extrato de folhas e frutos promoveu inibição

significativa das células tumorais na cavidade abdominal de 31,2% e 45,1% respectivamente.

Em relação à viabilidade celular do extrato natural de *S. barbatimam* Mart. (barbatimão) foi constatado que a CMM de 50 mg/mL, com melhor ação antimicrobiana contra todas as cepas dos microrganismos, apresentou em média 86% de viabilidade celular. Observou-se que o percentual de células sobreviventes em todos os grupos tratados esteve acima de 50%, variando entre 65 a 107%. Verificou-se que no grupo tratado com 6,25 mg/mL houve indução a proliferação celular, aumentando em 7% sua viabilidade em comparação ao grupo controle, porém esta CMM foi efetiva para 40% dos isolados de *S. aureus* e 90% de *S. epidermidis*. Quanto a indução à proliferação celular, Yoon et al. (2009) também observaram em seu estudo sobre a viabilidade celular e efeitos anti-inflamatórios do extrato de *S. baicalensis*, que nas concentrações crescentes de 25, 50, 100 e 200 µg/mL houve indução a divisão celular, uma vez que, estes grupos apresentaram-se com maior concentração de células em comparação ao grupo controle.

Na literatura há inúmeros estudos que verificaram a citotoxicidade de produtos naturais de origem vegetal, através do método MTT, em diversas linhagens celulares após diferentes períodos de contato. Yin et al. (2007) constataram citotoxicidade do extrato de *Sonchus oleraceus* L. em culturas de NCI-N87 (linhagem de câncer gástrico) com IC₅₀ entre 47,1 e 210,5 µg/mL. Com isso, os autores, verificaram potencial atividade deste extrato contra tumores. Em 2008, Silva et al. observaram atividade citotóxica do óleo essencial de *Casearia sylvestris* na linhagem de células tumorais HeLa, A-549 e HT-29, com capacidade inibitória de proliferação a 63,3, 60,7 e 90,6 µg/mL respectivamente. Yan et al. (2008) constataram citotoxicidade do óleo essencial de *Lindera strychnifolia* em linhagens tumorais (A549, HeLa e Hep G2) com IC₅₀ entre 22 e 38 µg/mL, sendo mais elevado para uma linhagem não tumoral (HUVEC, célula endotelial da veia umbilical

humana), com IC_{50} entre 126 e 163 $\mu\text{g/mL}$. Em 2009, Yang et al. estudaram a capacidade de 260 extratos de plantas em inibir a produção de óxido nítrico (NO) em culturas de RAW 264.7, após estímulo com LPS. Os autores constataram que extratos de 122 espécies apresentaram inibição de NO em 70% à concentração de 100 $\mu\text{g/mL}$. Também verificaram que o número de macrófagos que sofreram alterações pela exposição a estes extratos não foi significativamente alterado e o percentual de viabilidade celular das 122 espécies variaram entre 78,44% e 137,70%, com isso, percebeu-se que alguns extratos estimularam a divisão celular.

George et al. (2010), estudando o efeito citotóxico de 56 extratos de 44 plantas da região de Bangladesh, em culturas celulares de tumores pancreático, como Panc-1 (adenocarcinoma pancreático), Mia-Paca2 e Capan-1 e também em fibroblastos da linhagem Hs68, observaram que os extratos de *Petunia punctata*, *Alternanthera sessilis* e *Amoora chittagonga* foram citotóxicos para as linhagens tumorais com IC_{50} entre 20,3 e 31,4 $\mu\text{g/mL}$, 13,08 e 34,9 $\mu\text{g/mL}$ e 42,8 e 49 $\mu\text{g/mL}$, respectivamente. Somente *A. chittagonga* demonstrou baixa citotoxicidade em culturas de fibroblastos, com IC_{50} inferior a 100 $\mu\text{g/mL}$. Kim et al. (2010), verificando a citotoxicidade dos extratos de plantas das espécie *Picrorrhiza kurrooa* Royle, *Coptis chinensis* Franch (de diversas origens) e *Jeffersonia dubia* Bent. et Hook, constataram que *J. dubia* Bent. et Hook apresentou citotoxicidade com IC_{50} de 63 $\mu\text{g/mL}$ e analisando os extratos de *C. chinensis* Franch, oriundas de localidades diferentes, observaram efeitos citotóxicos semelhantes entre eles com IC_{50} de 135 a 149 $\mu\text{g/mL}$. Diante destes resultados os autores constataram que os extratos vegetais provenientes de localidades diferentes variaram suas atividades biológicas. Odabas et al. (2011), verificaram a citotoxicidade de *Ankaferd Blood Stopper*, um agente hemostático derivado de diferentes plantas como *Thymus vulgaris*, *G. glabra*, *Vitis vinifera*, *Alpina officinarum* e *Urtica dióica*, e constataram

que tal agente foi citotóxico para culturas de fibroblastos da polpa dental humana. Os autores verificaram que quanto maior a concentração do extrato menor a densidade óptica dos grupos analisados por espectrofotometria. Unlu et al. (2010), testando a citotoxicidade do óleo essencial de *Cinnamomum zeylanicum* Blume em culturas de 5RP7 (fibroblastos de embriões) e F2408 (fibroblasto de embriões de ratos) verificaram que houve citotoxicidade com IC₅₀ inferior a 20 µg/mL nas duas linhagens celulares.

Em 2011, Guerrero et al., após analisarem o extrato de tomate frente a culturas de HT-29 (linhagem tumoral), observaram que houve inibição de 50% do crescimento das células de câncer à concentração de 62,5 µg/mL na fração diluída em éter e 87 µg/mL na fração digerida, onde o extrato de tomate foi homogeneizado com água destilada e ácido ascórbico.

Ravikumara et al. (2011), após constatarem atividade antiviral do extrato de *Phyllanthus amarus* contra a replicação do vírus da Hepatite C, verificaram que o extrato em culturas de Huh7 (linhagem de carcinoma hepatocelular) não foi citotóxica, uma vez que, os percentuais de toxicidade estiveram abaixo de 10%. Diante destes achados, onde houve atuação dos óleos essenciais ou extratos naturais em linhagens tumorais celulares, nota-se a importância da continuidade dos estudos com plantas medicinais, uma vez que possam contribuir para o desenvolvimento e aplicação de métodos alternativos, porém com efetividade cientificamente comprovada, que possam controlar ou eliminar células tumorais. Estudos *in vivo*, também devem ser conduzidos neste mesmo sentido, inicialmente com cobaias e posteriormente em humanos.

Contudo, o estudo da citotoxicidade de extratos de plantas correlacionado com sua ação antimicrobiana é muito importante para direcionar sua aplicação clínica em diversas áreas da saúde, incluindo a odontológica, como em enxaguatórios bucais, dentifrícios, irrigantes do canal radicular, medicação intracanal, entre outras. Assim,

analisando somente a viabilidade celular, pode-se perceber que o extrato de cavalinha foi o único que na CMM efetiva para todas as cepas microbianas avaliadas apresentou importante citotoxicidade, com viabilidade celular inferior a 50%. Os demais extratos, na CMM efetiva para todos os microrganismos analisados, foram considerados com baixo potencial citotóxico, pois apresentaram viabilidade celular superior a 50%, sendo de 86% para barbatimão, 79% para alcaçuz e 76% para romã, de modo que estes extratos podem ser promissores para aplicação antimicrobiana.

6.3 Produção de citocinas em culturas de macrófagos

6.3.1 Metodologia

A citotoxicidade dos extratos naturais de *E. arvense* L. (cavalinha), *G. glabra* L. (alcaçuz), *P. granatum* L. (romã) e *S. barbatimam* Mart. (barbatimão) também foi verificada quanto à produção de citocinas pró-inflamatórias (IL-1 β e TNF- α) pelas culturas de macrófagos de camundongo (RAW 264.7) (Matsui et al., 2009; Koh et al., 2010) após o período de contato de 24 horas (Kim et al. (2008).

No presente estudo, as células foram expostas às CMM pré-determinadas nos testes de atividade antimicrobiana e posteriormente no teste com MTT. Assim, foram utilizadas as concentrações com capacidade de eliminação de 100% das cepas microbianas, no intuito de verificar se as CMM mais efetivas, em relação à eliminação de cepas microbianas, poderiam ser também citotóxicas, seja na redução da viabilidade celular ou na produção de citocinas.

Para quantificação de IL-1 β e TNF- α foram utilizados os kits para reação de ELISA do fabricante R & D System (Minneapolis, EUA), pois vários estudos publicados em periódicos internacionais com seletiva política editorial utilizam estes kits para dosar citocinas (Park et al., 2005; Sheeja, Kuttan, 2010; Shih et al., 2010;).

6.3.2 Resultados

Neste item buscou-se comparar a produção de IL-1 β e TNF- α por culturas de macrófagos (RAW 264.7) após estímulo com as CMM dos extratos naturais, no caso dos grupos tratados, ou sem estímulo, como ocorrido no grupo controle. Entretanto, as discussões foram feitas levando em consideração os níveis das duas citocinas produzidos por um determinado extrato.

O comportamento das culturas celulares foi diferente quanto à produção das citocinas após o período de exposição às CMM dos extratos naturais. Nos grupos controle (sem estímulo ativador) também houve discrepância na produção basal de citocinas, uma vez que a quantificação de IL-1 β foi em média 2,20 pg/mL e de TNF- α foi em média de 41,96 pg/mL. No estudo de Kim et al. (2011), sobre o efeito protetor do extrato de *Chrysanthemum indicum* Linn. em culturas de BV-2 (microgliócitos com elevado poder fagocitário do sistema nervoso), os autores observaram que o nível basal de TNF- α , IL-1 β e IL-6, sem estímulo, estava em 110,10, 17,85 e 238,46 pg/mL, respectivamente, e após 24 horas de estímulo com LPS os níveis destas citocinas aumentaram 17,28, 16,36 e 12,89 pg/mL, respectivamente, no entanto, quando aplicaram o extrato natural de *C. indicum* Linn. na concentração de 100 μ g/mL constataram inibição da produção de TNF- α , IL-1 β e IL-6 em 82,39, 77,46 e 86,73% respectivamente.

Em relação aos grupos tratados com CMM do extrato natural de alcaçuz (*G. glabra* L.), observou-se que a produção de TNF- α (4,92 pg/mL) foi superior a produção de IL-1 β (1,99 pg/mL). Sheeja e Kuttan (2010), também verificaram em seu estudo níveis de TNF- α mais elevados que níveis de IL-1 β . Estes autores utilizaram o extrato natural de *Andrographis paniculata* e seu componente andrografolida para verificar a resposta imune mediada por células em animais com tumores metastáticos. Constataram que no sétimo dia após a indução tumoral, o grupo de animais com tumor metastático apresentou elevado nível de IL-1 β (32,1 pg/mL), uma vez que consideraram 17,8 pg/mL como nível normal. Após administração de 10 mg/dose/animal do extrato de *A. paniculata* e 500 μ g/dose/animal do composto andrografolida, os autores verificaram que houve redução dos níveis desta citocina no mesmo dia para 26 pg/mL, no caso do extrato, e 27,6 aplicando o composto. No 21º dia observaram elevação dos níveis da citocina, 53,6 pg/mL, no grupo não tratado, entretanto, no grupo tratado, verificaram significativa redução após utilização do extrato, 19,89 pg/mL, e do composto, 23,7 pg/mL. Quanto aos níveis de TNF- α , os autores puderam verificar que, no sétimo dia após indução tumoral, estiveram elevados no grupo controle (262,1 pg/mL), comparados a níveis normais desta citocina (20 pg/mL), e após utilização do extrato de *A. paniculata* constataram redução de TNF- α para 145,5 pg/mL e através da andrografolida, 153,3 pg/mL, no mesmo dia. No 21º após a indução tumoral, observaram que no grupo não tratado o nível desta citocina apresentou pico de 630,8 pg/mL e no grupo tratado redução pela administração do extrato (65,4 pg/mL) e da andrografolida (153,3 pg/mL). No presente estudo, o extrato de alcaçuz apresentou produção de TNF- α significativamente menor que o grupo controle e produção de IL-1 β estatisticamente semelhante ao controle, de modo que, considerando estes dois parâmetros, o extrato de alcaçuz não apresentou citotoxicidade. Assim, torna-se interessante ampliar os estudos com

relação a seu possível potencial anti-inflamatório em cultura celular ativada por LPS, a fim de demonstrar além de sua ação antimicrobiana sua possível ação anti-inflamatória, o que ampliará a utilização terapêutica do alcaçuz nas diversas áreas da saúde.

Quanto aos grupos tratados com CMM do extrato natural de barbatimão (*S. barbatimam* Mart.), os níveis de IL-1 β (3,98 pg/mL) foram mais altos que os níveis de TNF- α (0,85 pg/mL). Diferentemente das observações do estudo de Kim et al. (2010) sobre a citotoxicidade dos extratos de *Picrorrhiza kurrooa* Royles, *Coptis chinensis* Franch (oriundos de diversas localidades) e *Jeffersonia dubia* Bent. et Hook, onde os autores verificaram o efeito anti-inflamatório destes extratos através da secreção de citocinas pró-inflamatórias (IL-1 α , IL-6, TNF- α) em culturas de RAW 264.7 estimuladas por LPS. Os resultados de sua pesquisa demonstraram que os extratos de *C. chinensis* Franch inibiram completamente a produção de IL-1 α , após estímulo com LPS e reduziram a síntese de IL-6, TNF- α de 10 a 70%. Entretanto, *P. kurrooa* Royles demonstrou baixa redução de citocinas. Constataram também que nos grupos tratados com *J. dubia* Bent. et Hook, houve redução da secreção de IL-1 α , porém aumento da produção de TNF- α e IL-6. Com isso, os autores concluíram que os extratos de *C. chinensis* Franch apresentaram boa atividade anti-inflamatória, uma vez que, inibiram a produção de citocinas e por outro lado o extrato de *P. kurrooa* Royles foi pouco efetivo, não apresentando atividade anti-inflamatória.

Trabalhando com extrato etanólico de *Boerhaavia diffusa*, Mehrotra et al. (2002) observaram que tal planta medicinal apresentou capacidade de inibir a secreção de IL-2 e TNF- α em culturas de células mononucleares de sangue periférico (PBMC) através da concentração de 10 μ g/mL após estímulo com LPS e fitohemaglutinina. Shih et al. (2010) estudando o extrato de *Euphorbia hirta* L. a 0,1 μ g/mL verificaram que tal extrato foi capaz de inibir a produção de IL-6 e TNF- α em culturas de macrófagos após terem sido estimuladas por LPS. Contudo, no presente

estudo a proposta inicial não era avaliar o potencial anti-inflamatório dos extratos e sim seu potencial citotóxico, de modo que, em comparação com o grupo controle, o extrato de barbatimão apresentou valores significativamente menores de TNF- α , demonstrando, por este parâmetro, baixo efeito citotóxico. Por outro lado, em relação a IL-1 β , o extrato de barbatimão apresentou valores significativamente maiores que o controle, demonstrando, por este parâmetro, maior efeito citotóxico. Assim, estudos futuros devem ser realizados com o intuito de analisar o real potencial anti-inflamatório do barbatimão em cultura celular ativada por LPS.

Em relação aos grupos tratados com CMM de romã (*P. granatum* L.), houve plena inibição de produção de TNF- α , no entanto, foi observada produção de 7,72 pg/mL de IL-1 β . Jung et al. (2006) constatarem a capacidade do extrato metanólico de romã (*P. granatum* L.) de inibir a produção de TNF- α em culturas celulares estimuladas por LPS. Park et al. (2005), estudando a atividade anti-inflamatória de plantas medicinais, verificaram que em culturas de RAW 264.7 houve inibição da secreção de TNF- α em 74%, utilizando o extrato natural de *Forsythia suspense* (Thunb.) Vahl a 2,0 mg/mL, entretanto, aplicando o extrato *Lonicera japonica* Thunb., observaram inibição acima de 70% utilizando esta mesma concentração. Os autores verificaram também que o extrato de *Houttuynia cordata* Thunb. inibiu a secreção desta citocina à concentração de 0,0625 e 0,125 mg/mL, e constaram ainda que o extrato de *Glycyrrhiza uralensis* Fisch obteve o percentual de inibição de TNF- α em 30% a 0,0625. Desta forma, concluíram que o extrato de *F. suspense* foi o extrato com maior capacidade de inibir a secreção de TNF- α . Já com relação à produção de IL-1 β , no presente estudo o extrato de romã induziu produção significativamente superior ao controle, o que, por este parâmetro, aumenta seu potencial citotóxico, sendo interessante ampliar os estudos de citotoxicidade com este extrato e outras citocinas, incluindo análise de seu possível potencial anti-inflamatório na presença de LPS, a fim de obter resultados mais conclusivos.

Os grupos tratados com CMM de cavalinha expressaram valores de IL-1 β e TNF- α semelhantes, isto é, 1,32 pg/mL para IL-1 β e 0,83 pg/mL para TNF- α . Com relação ao controle, o extrato de cavalinha apresentou produção semelhante de IL-1 β e produção significativamente menor de TNF- α . Este fato, dos níveis de citocinas serem maiores em grupos controle que em grupos tratados, também foi observado por Lee et al. (2011) em seu estudo, onde constataram redução dos níveis de citocinas em grupos após tratamento. No estudo de Lee et al. (2011) os efeitos antiasmáticos do extrato de *Petasites japonicus*, foram verificados pela quantificação de IL-2, IL-4, IL-5, IL-13, e TNF- α em culturas de Jurkat, uma linhagem celular imortalizada de linfócito T, e IL-6, IL-8 e MCP-1 (proteína quimiotática de monócitos-1) em culturas de THP-1 (linhagem monocítica leucêmica). Os autores utilizaram o extrato de ácaro para estimular as células a produzirem as citocinas e o extrato de *P. japonicus* foi utilizado para testar sua capacidade inibitória contra a produção delas. Os resultados indicaram que o extrato de *P. japonicus* apresentou efeito anti-inflamatório, devido ter diminuído a produção das citocinas após indução pelo extrato de ácaro. Como mencionado anteriormente, o objetivo principal do presente estudo não foi avaliar o potencial anti-inflamatório dos extratos e sim seus possíveis efeitos citotóxicos. Assim, de acordo com os resultados obtidos da produção de citocinas, o extrato de cavalinha apresentou baixo potencial citotóxico, entretanto, foi o extrato que na CMM efetiva para todas as cepas microbianas avaliadas, apresentou a menor viabilidade celular (48%).

Contudo, de acordo com todos os parâmetros de citotoxicidade avaliados neste estudo, o extrato de alcaçuz, na CMM efetiva para todas as cepas, foi o que apresentou menor citotoxicidade, com produção de citocinas semelhante ou menor que o controle e viabilidade celular em torno de 80%. Assim, é bastante promissora a utilização antimicrobiana deste extrato nas diversas áreas da saúde, incluindo a odontológica, como em enxaguatórios bucais, irrigantes dos

canais radiculares, entre outras. No entanto, todos os extratos avaliados devem ter seus estudos ampliados, especialmente no que se refere ao possível efeito anti-inflamatório, a fim de ampliar a utilização terapêutica destes fitoterápicos.

7 CONCLUSÃO

Com base nos resultados apresentados neste estudo, pode-se concluir que:

a) Todos os extratos naturais avaliados, *E. arvense* L. (cavalinha), *G. glabra* L. (alcaçuz), *P. granatum* L. (romã), *S. barbatimam* Mart. (barbatimão), apresentaram atividade antimicrobiana sobre cepas padrão e clínicas de *S. aureus*, *S. epidermidis*, *S. mutans*, *C. albicans*, *C. glabrata* e *C. tropicalis*;

b) A eliminação total das cepas microbianas ocorreu com a CMM de 50 mg/mL para os extratos naturais de *E. arvense* L. (cavalinha), *P. granatum* L. (romã) e *S. barbatimam* Mart. (barbatimão) e a 100 mg/mL para o extrato natural de *G. glabra* L. (alcaçuz);

c) Com relação à citotoxicidade, o extrato de *E. arvense* L. (cavalinha) foi mais citotóxico, com viabilidade celular inferior a 50%, entretanto, com baixa produção de citocinas. Os extratos de *S. barbatimam* Mart. (barbatimão), *G. glabra* L. (alcaçuz) e *P. granatum* L. (romã) foram menos citotóxicos, com viabilidade celular superior a 75%,

no entanto, os extratos de *P. granatum* L. (romã) e *S. barbatimam* Mart. (barbatimão) apresentaram maior produção de IL-1 β . Sendo assim, de acordo com os parâmetros de citotoxicidade avaliados, o extrato de *G. glabra* L. (alcaçuz) foi o menos citotóxico.

8 REFERÊNCIAS*

Alves TMA, Silva AF, Brandão M, Grandi TSM, Smânia EF, Smânia Jr A, et al. Biological screening of Brazilian medicinal plants. Mem Inst Oswaldo Cruz. 2000;95:367-73.

Al-Zorey NS. Antimicrobial activity of pomegranate (*Punica granatum* L.) fruit peels. Int J Food Microbiol. 2009;134:244-8.

Alzugaray D, Alzugaray C. Plantas que curam. A natureza a serviço da saúde. São Paulo: Três Livros e Fascículos; 1983.

Ambawade SD, Kasture VS, Kasture SB. Anticonvulsant activity of roots and rhizomes of *Glycyrrhiza glabra*. Indian J Pharmacol. 2002;34:251– 5.

Ambawade SD, Kasture VS, Kasture SB. Anxiolytic activity of *Glycyrrhiza glabra* Linn. J Nat Rem. 2001;2:130 – 4.

Arendorf TM, Walker DM. The prevalence and intra-oral distribution of *Candida albicans* in man. Arch Oral Biol. 1980;25:1-10.

Aschwanden C. Herbs for health, but how safe are there? Bull. WHO. 2001;79(7):691-2.

Asl MN, Hosseinzadeh H. Review of pharmacological effects of *Glycyrrhiza* sp. And its bioactive compounds. Phytother Res. 2008;22:709-24.

*Baseado em: International Committee of Medical Journal Editors Uniform Requirements for Manuscripts Submitted to Biomedical journals: Sample References [homepage na Internet]. Bethesda: US NLM; c2003 [disponibilidade em 2008 ago; citado em 25 ago.] Disponível em: http://www.nlm.nih.gov/bsd/uniform_requirements.html

Audi EA, Toledo DP, Peres PG, Kimura E, Pereira WK, Mello JC, et al. Gastric antiulcerogenic effects of *Stryphnodendron adstringens* in rats. *Phytother Res.* 1999;13:264–6.

Barbieri DSV, Vicente VA, Fraiz FC, Lavoranti OJ, Svidzinski TIE, Pinheiro RL. Analysis of the *in vitro* adherence of *Streptococcus mutans* and *Candida albicans*. *Braz J Microbiol.* 2007;38:624-31.

Bedoya LM, Sanches SP, Abad MJ, Bermejo P, Alcamí J. Screening of selected plant extract for *in vitro* inhibitory activity on human immunodeficiency virus. *Phytother Res.* 2002;16:550-4.

Bialonska D, Kasimsetty SG, Schrader KK, Ferreira D. The effect of pomegranate (*Punica granatum* L.) byproducts and ellagitannins on the growth of human gut bacteria. *J Agric Food Chem.* 2009;57:8344–9.

Bisset NG, editor. Herbal drugs and pharmaceuticals. Stuttgart: Medpharm Scientific Publishers; 1994.

Bodet C, Andrian E, Tanabe S, Grenier D. *Actinobacillus actinomycetemcomitans* lipopolysaccharide regulates matrix metalloproteinase, tissue inhibitors of matrix metalloproteinase, and plasminogen activator production by human gingival fibroblasts: a potential role in connective tissue destruction. *J Cell Physiol.* 2007;212(1):189-94.

Bradley PR, editor. British herbal compendium. England: British Herbal Medicine Association; 1992.

Braga LC, Shupp JW, Cummings C, Jett M, Takahashi JA, Carmo LS, et al. Pomegranate extract inhibits *Staphylococcus aureus* growth and subsequent enterotoxin production. *J Ethnopharmacol.* 2005;96:355-9.

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

Bryant SG, Brown CS. Current concepts in clinical therapeutics: major affective disorders. Clin Pharm. 1986;5:385–95.

Burton GRW, Engelkirk PG. Microbiology for the health sciences. 7th. ed. USA: Lippincott Williams & Wilkins; 2004.

Calixto JB. Efficacy, safety, quality control, marketing and regulatory guidelines for herbal medicines (Phytotherapeutic Agents). Braz J Med Biol Res. 2000;689:179-89.

Calixto JB. Twenty-five years of research on medicinal plants in Latin America: A personal view. J Ethnopharmacol. 2005;100:131-4.

Cetojevic-Simin DD, Brunet JMC, Bogdanovic GM, Djilas SM, Cetkovic GS, Tumbas VT, et al. Antioxidative and Antiproliferative Activities of Different Horsetail (*Equisetum arvense* L.) Extracts. J Med Food. 2010;13(2):452–9.

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

Chopra RN, Nayer SL, Chopra IC. Glossary of Indian Medicinal Plants. 3rd ed. India: Council of Scientific and Industrial Research; 1992.

Collier AC, Pritsos CA. The mitochondrial uncoupler dicumarol disrupts the MTT assay. Bioch Pharm. 2003;66:281-7.

Das AK, Mandal SC, Banerjee SK, Sinha S, Das J, Sasha BP, et al. Studies on antidiarrhoeal activity of *Punica granatum* seed extract in rats. J Ethnopharmacol. 1999;68:205-8.

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

Dell'Agli M, Galli GV, Corbett Y, Taramelli D, Lucantonio L, Habluetzel A. Antiplasmodial activity of *Punica granatum* L. fruit rind. J Ethnopharmacol. 2009;125:279–85.

Deurenberg RH, Stobberingh EE. The evolution of *Staphylococcus aureus*. Infect Genet Evol. 2008;8:747–63.

Dhingra D, Parle M, Kulkarni SK. Memory enhancing activity of *Glycyrrhiza glabra* in mice. J Ethnopharmacol. 2004;91:361–5.

Dhingra D, Sharma A. Antidepressant-like activity of *Glycyrrhiza glabra* L. in mouse models of immobility tests. Neuropsychopharmacology. 2006;30:449–54.

Dignani MC, Solomkin JS, Anaissie E. Candida. In: Anaissie E, McGinnis MR, Pfaller MA (eds). Medical Mycology. Filadélfia: Churchill Livingstone, 2003. p. 195–239.

Duarte MCT. Atividade antimicrobiana de plantas medicinais e aromáticas utilizadas no Brasil. Multi Ciência: construindo a história dos produtos naturais. 2006.

Durupt F, Mayor L, Bes M, Reverdy ME, Vandenesch F, Thomas L, et al. Prevalence of *Staphylococcus aureus* toxins and nasal carriage in furuncles and impetigo. Br J Dermatol. 2007;157:1161–7.

Felipe AMM, Rincão VP, Benati FJ, Linhares REC, Galina KJ, Toledo CEM, et al. Antiviral effect of *Guazuma ulmifolia* and *Stryphnodendron adstringens* on poliovirus and bovine herpesvirus. Biol Pharm Bull. 2006; 29(6):1092–5.

Fenner R, Betti AH, Mentz LA, Rates SMK. Plantas utilizadas na medicina popular brasileira com potencial atividade antifúngica. Rev Bras Cienc Farm. 2006;42(3):370–93.

Ferreira MB, Myiagi S, Nogales CG, Campos MS, Lage-Marques JL. Time and concentration-dependent cytotoxicity of antibiotics used in endodontic therapy. *J Appl Oral Sci.* 2010;18(3):259-63

Freshney RI. Measurement of cytotoxicity and viability. 2nd ed. In: *Culture of animal cells: a manual of basic technique*. New Yourk: Willy-Liss; 1990. p. 7-13.

Fukai T, Marumo A, Kaitou K, Kanda T, Terada S, Nomura T. Antimicrobial activity of licorice flavonoids against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Fitoterapia.* 2002;73:536– 9.

George S, Bhalerao SV, Lidstone EA, Ahmad IS, Abbasi A, Cunningham BT, et al. Cytotoxicity screening of Bangladeshi medicinal plant extracts on pancreatic cancer cells. *BMC Complement Altern Med.* 2010;10:52-63.

Gracious RR, Selvasubramanian S, Jayasundar S. Immunomodulatory activity of *Punica granatum* in rabbits - a preliminary study. *J Ethnopharmacol.* 2001;78:85–7.

Graebin CS, Verlia H, Guimarães JA. Glycyrrhizin and Glycyrrhetic Acid: Scaffolds to Promising New Pharmacologically Active Compounds. *J Braz Chem Soc.* 2010;(21)9:1595-1615.

Graefe EU, Veit M. Urinary metabolites of flavonoids and hydroxycinnamic acids in humans after application of a crude extract from *Equisetum arvense*. *Phytomedicine.* 1999;6:239–46.

Guerrero JLG, Bueno RR, Garcia IR, Sanchez CL. Cytotoxicity Screening of Several Tomato Extracts. *J Med Food.* 2011;14:40–5.

Gupta VK, Fatima A, Faridi U, Negi AS, Shanker K, kumar JK, et al. Antimicrobial potencial of *Glycyrrhiza glabra* roots. *J Ethnopharmacol.* 2008;116:377-80.

Hadacek F, Greger H. Testing antifungal natural products: methodologies, comparability of results and assay choice. *Phytochem Anal.* 2000;11:137-47.

Haidari M, Ali M, III SWC, Madjid M. Pomegranate (*Punica granatum*) purified polyphenol extract inhibits influenza virus and has a synergistic effect with oseltamivir. *Phytomedicine.* 2009;16:1127-36.

Harvey A. Strategies for discovering drug from previously natural products. *Drug Discov Today.* 2000;5(7):297-300.

Haslam E. Natural polyphenols (vegetable tannins) as drug: Possible modes of action. *J Nat Prod.* 1996;59:205-15.

Hayouni EA, Miled K, Boubakerc S, Bellasfar Z, Abedrabba M, lwaski H, et al. Hydroalcoholic extract based-ointment from *Punica granatum* L. peels with enhanced *in vivo* healing potential on dermal wounds. *Phytomedicine.* In press 2011.

Heinrich PC, Castell JV, Andus T. Interleukin-6 and the acute phase response. *Biochem J.* 1990;265:621-36.

Hikino H. Recent research on oriental medicinal plants. In: Wagner H, Hikino H, Farnsworth NR, editors. *Economic and medicinal plant research.* London: Academic press; 1985. p. 53.

Hoffman D. *The new holistic herbal.* Shaftesbury: Element Books; 1990.

Holetz FB, Ueda TN, Dias FBP. Biological effects of extracts obtained from *Stryphnodendron adstringens* on *Herpetomonas samuelpessoai*. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 2005;100:397-401.

Hong C, Lin S, Kok S, Cheng S, Lee M, Wang T, et al. The role of lipopolysaccharide in infectious bone resorption of periapical lesion. *J Oral Pathol Med.* 2004;33:162-9.

Hostettmann K, Queiroz EF, Viera PC. Princípios ativos de plantas superiores. São Carlos: Eduscar; 2003.

Hsiung WY, Kadir HA. *Leea indica* ethyl acetate fraction induces growth-inhibitory effect in various cancer cell lines and apoptosis in Ca Ski human cervical epidermoid carcinoma cells. Evid Based Complement Altern Med. 2011;2011:1-13.

Ishida K, Mello JCP, Cortez DAG, Dias FBP, Nakamura TU, Nakamura CV. Influence of tannins from *Stryphnodendron adstringens* on growth and virulence factors of *Candida albicans*. J Antimicrob Chemother. 2006;58:942-9.

Ishida K, Rozenenthal S, Mello JCP, Nakamura CV. Activity of tannins from *Stryphnodendron adstringens* on *Cryptococcus neoformans*: effects on growth, capsule size and pigmentation. Ann Clin Microbiol Antimicrob. 2009;8:1-10.

Janeway CA, Travers P, Walport M, Shlomchik MJ. Imunobiologia: o sistema imune na saúde e na doença. 6. ed. Porto Alegre: Artmed; 2007.

Joksic G, Stankovic M, Novak A. Antibacterial medicinal plants *Equiseti herba* and *Ononidis radix* modulate micronucleus formation in human lymphocytes in vitro. J Environ Pathol Toxicol Oncol. 2003;22:41-8.

Joly AB. Botânica. Introdução à taxonomia vegetal. 5.ed. São Paulo: Nacional; 1979.

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

Jung CH, Jun CY, Lee S, Park CH, Cho K, Ko SG. *Rhus verniciflua* stokes extract: radical scavenging activities and protective effects on H₂O₂-induced cytotoxicity in macrophage RAW 264.7 cell lines. Biol Pharm Bull. 2006;29(8):1603-7.

Jurenka J. Therapeutic applications of pomegranate (*Punica granatum* L.): a review. *Altern Med Rev*. 2008;13(2):128-44.

Takegawa H, Matsumoto H, Satoh T. Inhibitory effects of some natural products on the activation of hyaluronidase and their anti-allergic actions. *Chem Pharm Bull*. 1992;40:1439-42.

Kanazawa I. Short review on monoamine oxidase and its inhibitors. *Eur Neurol*. 1994;34(3):36–9.

Kanazawa M, Satomi Y, Mizutani Y, Uikimura O, Kawauchi A, Sakai T, et al. Isoliquiritigenin inhibits the growth of prostate cancer. *Eur Urol*. 2003;43:580-6.

Kim IS, Ko HM, Koppula S, Kim BW, Choi DK. Protective effect of *Chrysanthemum indicum* Linne against 1-methyl-4-phenylpyridinium ion and lipopolysaccharide-induced cytotoxicity in cellular model of Parkinson's disease. *Food Chem. Toxicol*. 2011;49:963–73.

Kim JM, Jung HA, Choi JS, Min BS, Lee NG. Comparative analysis of the anti-inflammatory activity of huang-lian extracts in lipopolysaccharide-stimulated RAW264.7 murine macrophage-like cells using oligonucleotide microarrays. *Arch Pharm Res*. 2010;33(8):1149-57.

Kim JY, Oh TH, Kim BY, Kim SS, Lee NH, Hyun C. Chemical composition and anti-inflammatory effects of essential oil from *Farfugium japonicum* flower. *J Oleo Sci*. 2008;57(11):623-8.

Ko RJ. Causes, epidemiology and clinical evaluation of suspected herbal poisoning. *Clin Toxicol*. 1999;37(6):697-708.

Koh YJ, Cha DS, Ko JS, Park HJ, Choi HD. Anti-Inflammatory effect of *Taraxacum officinale* leaves on lipopolysaccharide-Induced inflammatory responses in RAW 264.7 cells. *J Med Food*. 2010;13(4):870–8.

Koulaouzidou EA, Margelos J, Beltes P, Kortsaris A. Cytotoxic effect of different concentrations of neutral and alkaline EDTA solutions used as root canal irrigants. *J Endod*. 1999;25:21-3.

Kraychete DC, Calasans MTA, Valente. CML Citocinas Pró-inflamatórias e Dor. *Rev Bras Reumatol*. 2006;46(3):199-206.

Lata S, Saxena RS, Kumar A, Kakkar S, Srivastava VK, Saxena KK. Comparative antipyretic activity of *Ocimum sanctum*, *Glycyrrhiza glabra* and aspirin in experimentally induced pyrexia in rats. *Indian J Pharmacol*. 1999;31:71–5.

Lee JS, Yang EJ, Yunb CY, Kimd DH, Kim IS. Suppressive effect of *Petasites japonicus* extract on ovalbumin-induced airway inflammation in an asthmatic mouse model. *J Ethnopharmacol*. 2011;133:551–7.

Lee YY, Hung SL, Pai SF, Lee YH, Yang SF. Eugenol suppressed the expression of lipopolysaccharide-induced proinflammatory mediators in human macrophages. *J Endod*. 2007;33:698-702.

Lima JCS, Martins DTO, Souza PT. Experimental evaluation of stem bark of *Stryphnodendron adstringens* (Mart.) Coville for antiinflammatory activity. *Phytother Res*. 1998;12:218–20.

Lin SK, Wang C, Huang S, Lee J, Chiang C, Lan W, et al. Induction of dental pulp fibroblast matrix metalloproteinase-1 and tissue inhibitor of metalloproteinase-1 gene expression by interleukin-1 α and tumor necrosis factor- α through a prostaglandin-dependent pathway. *J Endod*. 2001;27(3):185-9.

Luize OS, Tiuman TS, Morello LG, Maza PK, Nakamura TU, Dias Filho BP, et al. Effects of medicinal plant extracts on growth of *Leishmania* (L.) *amazonensis* and *Trypanosoma cruzi*. *Braz J Pharm Sci*. 2005;41(1):85-94.

Machado T, Pinto A, Pinto M, Leal I, Silva M, Amaral A, et al. *In vitro* activity of Brazilian medicinal plants, naturally occurring naphthoquinones and their analogues, against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. Int J Antimicrob Agents. 2003;21:279–284.

Machado TB, Leal ICR, Amaral ACF, Santos KRN, Silva MG, Kuster RM. Antimicrobial ellagitannin of *Punica granatum* fruits. J Braz Chem Soc. 2002;13(5):606-10.

Martins DMFH, Santos Jr JG, Russi M, Lanziotti VMNB, Leal LKAM, Cunha GMA. Antinociceptive and antiinflammatory properties of the hydroalcoholic extract of stems from *Equisetum arvense* L. in mice. Pharmacol Res. 2004;49:239–43.

Matsui M, Kumar-Roine S, Darius HT, Chinain M, Laurent D, Pauillac S. Characterisation of the anti-inflammatory potential of *Vitex trifolia* L. (Labiatae), a multipurpose plant of the Pacific traditional medicine. J Ethnopharmacol. 2009;126(3):427-33

Maza PK, Tiuman TS, Ueda-Nakamura T, Dias BPF, Mello JCP, Morgado JAD, et al. Effects of *Stryphnodendron adstringens* on ultrastructures of promastigote forms of *Leishmania amazonensis*. In: Programs and Abstracts Nineteenth Congress of the Brazilian Society for Microscopy and Microanalysis; 2003. Rio de Janeiro. Acta Microscopia. 2003;12:317–8.

McDermott MF: TNF and TNFr biology in health and disease. Cell Mol Biol (Noisy-le-grand) 2001;47:619-35.

Mehrotra S, Mishra KP, Maurya R, Srimal RC, Singh VK. Immunomodulation by ethanolic extract of *Boerhaavia diffusa* roots. Int. Immunopharmacol. 2002;2:987–96.

Meléndez PA, Capriles VA. Antibacterial properties of tropical plants from Puerto Rico. Phytomed. 2006;13:272-6.

Mendes NM, Queiroz RO, Grandi TSM, Anjos AMG, Oliveira AB, Zani CL. Screening of Asteraceae (Compositae) plant extracts for molluscicidal activity. Mem Inst Oswaldo Cruz. 1999;94:411-12.

Mendonça RC, Felfili JM, Walter BMT, Silva Jr MC, Rezende AV, Filgueiras TS, et al. Flora vascular do cerrado. In: Sano SM, Almeida SP, editors. Cerrado - Ambiente e Flora. Planaltina: Embrapa. 1998. p 289–556.

Miguel LM. Uso sustentável da biodiversidade na Amazônia Brasileira: experiências atuais e perspectivas das bioindústrias de cosméticos e fitoterápicos [dissertação]. São Paulo. Faculdade de Filosofia, Letras e Ciências Humanas: Universidade de São Paulo - USP, 2007.

Milovanovic V, Radulovic N, Todorovic Z, Stankovic M, Stojanovic G. Antioxidant, Antimicrobial and Genotoxicity Screening of Hydro-alcoholic Extracts of Five Serbian *Equisetum* Species. Plant Foods Hum Nutr. 2007;62:113–9.

Mitscher LA, Park HY, Clarck D. Antimicrobial agents from higher plants. Isoflavonoids and related substances from *Glycyrrhiza glabra* L. var. Typica. J Nat Prod. 1980;43(2):259-69.

Monte FH, Santos JG, Russi M, Bispo Lanziotti VM, Leal LK, Cunha GMA. Antinociceptive and anti-inflammatory properties of the hydroalcoholic extract of stems from *Equisetum arvense* L. in mice. Pharmacol Res. 2004;49:239– 43.

Mossman T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assay. J Immunol Methods. 1983;65:55-63.

Motsei ML, Lindsey KL, van Staden J, Jager AK. Screening of traditionally used South African plants for antifungal activity against *Candida albicans*. J Ethnopharmacol. 2003;86:235-41.

Nagai T, Myoda T, Nagashima T. Antioxidative activities of water and ethanol extract from field horsetail (tsukushi) *Equisetum arvense* L. Food Chem. 2005;91:389–94.

Navarro V, Villarreal ML, Rojas G, Lozoya X. Antimicrobial evaluation of some plants used in mexican traditional medicine for the treatment of infectious diseases. *J Ethnopharmacol.* 1996;53:143-7.

Naz S, Siddiqi R, Ahmad S, Rasool S, Sayeed S. Antibacterial activity directed isolation of compounds from *Punica granatum*. *Int J Food Sci Nutr.* 2007;72:341–5.

NCCLS. Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria That Grow Aerobically; Approved Standard. 6th ed. NCCLS document M7-A6 [ISBN 1-56238-486-4]. NCCLS, USA, 2003.

NCCLS. Método de Referência para Testes de Diluição em Caldo para a Determinação da Sensibilidade a Terapia Antifúngica das Leveduras; Norma Aprovada. 2. ed. NCCLS document M27-A2 [ISBN 1-56238-469-4]. NCCLS, Estados Unidos, 2002.

Negi OS, Jayaprakasha GK. Antioxidant and antibacterial activities of *Punica granatum* peel extracts. *J Food Sci.* 2003;68(4):1473-7.

Novick RP. Autoinduction and signal transduction in the regulation of staphylococcal virulence. *Mol Microbiol* 2003; 48: 1429–49.

Odabas ME, Ertük M, Cagdas C, Tüzüner T, Tulunoglu O. Cytotoxicity of a new hemostatic agent on human pulp fibroblasts *in vitro*. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal.* 2011;16(4):e584-7.

Ody P, Kindersley D. The complete medicinal herbal. New York: DK Publishing; 1993.

Okada K, Tanaka J, Miyashita A, Imoto K. High-speed liquid chromatographic analysis of constituents in licorice root I Determination of glycyrrhizin. *Yakugaku Zasshi.* 1981;101:822– 8.

Oliveira LP, Pinheiro RC, Vieira MS, Paula JR, Bara MTF, Valadares MC. Atividade citotóxica e antiangiogênica de *Punica granatum* L., Punicaceae. *Rev Bras Farmacogn.* 2009;20(2):201-7.

Ooshima T, Osaka Y, Sasaki H, Osawa K, Yasuda H, Matsumura W, et al. Caries inhibitory activity of cacao bean husk extract *in vitro* and animals experiments. Arch Oral Biol. 2000;45(8):639-45.

Park E, Kum S, Wang C, Park SY, Kim BS, Levis GS. Anti-inflammatory activity of herbal medicines: inhibition of nitric oxide production and tumor necrosis factor- α secretion in an activated macrophage-like cell line. Am J Chinese Med. 2005;(33)3:415–24.

Pattnaik S, Subramanyam VR, Bapaji M, Kole CR. Antibacterial and antifungal activity of aromatic constituents of essential oils. Microbios. 1997;89:39–46.

Pellati D, Fiore C, Armanini D, Rassu M, Bertoloni G. In vitro effects of glycyrrhethinic acid on the growth of clinical isolates of *Candida albicans*. Phytother Res. 2009;23:572–4.

Pereira JV, Pereira MSV, Sampaio FC, Sampaio MCC, Alves PM, Araújo CRF, et al. Efeito antibacteriano e antiaderente *in vitro* do extrato de *Punica granatum* L. sobre microrganismos do biofilme dental. Rev Bras Farmacognosia. 2006;16(1):88-93.

Pereira EMR, Gomes RT, Freire NR, Aguiar EG, Brandão MGL, Santos VR. *In vitro* antimicrobial activity of Brazilian medicinal plant extracts against pathogenic microorganisms of interest to dentistry. Planta Med. 2011;77:401–4.

Pinto AC, Silva DHS, Bolzani VS, Lopes NP, Epifânio RA. Produtos naturais: atualidades, desafios e perspectivas. Química Nova. 2002;25(1)45-61.

Prashanth D, Asha MK, Amit A. Antibacterial activity of *Punica granatum*. Fitoter. 2001;72:171-3.

Radulovic N, Stojanovic G, Palic R. Composition and antimicrobial activity of *Equisetum arvense* L. essential oil. Phytother Res. 2006;20:85–8.

Ramos DF, Leitão GG, Costa FN, Abreu L, Villarreal JV, Leitão SG, et al. Investigation of the antimycobacterial activity of 36 plant extracts from the Brazilian Atlantic Forest. *Braz J Pharm Sci.* 2008;44(4):669-74.

Rates SMK. Plants as source of drugs. *Toxicon.* 2001;39:603-13.

Ravikumara YS, Ray U, Nandhitha M, Perween A, Naikaa HR, Khannab N, et al. Inhibition of hepatitis C virus replication by herbal extract: *Phyllanthus amarus* as potent natural source. *Virus Res.* 2011;158(1-2):89-97. Epub 2011 Mar 31.

Reddy MK, Gupta SK, Jacob MR, Khan SI, Ferreira D. Antioxidant, antimalarial and antimicrobial activities of tannin-rich fractions, ellagitannins and phenolic acids from *Punica granatum* L. *Planta Med.* 2007;73:461–7.

Robbers JE, Speedie MK, Tyler VE. Pharmacognosy and pharmacobiotechnology. Baltimore: Williams & Wilkins; 1996.

Rousseaux CG, Schachter H. Regulatory issues concerning the safety, efficacy, and quality of herbal remedies. *Birth Defects Research B.* 2003;68(6):505-10.

Sakurai N, Iizuka T, Nakayama S, Funayama H, Noguchi M, Nagai M. Vasorelaxant activity of caffeic acid derivatives from *Cichorium intybus* and *Equisetum arvense*. *Yakugaku Zasshi.* 2003;123:593–8.

Sandros J, Papapanou P, Dahlén G. *Porphyromonas gingivalis* invades oral epithelial cells in vitro. *J Periodont Res.* 1993;28:219–26.

Santos CAM, Torres KR, Leonart R. Plantas medicinais (Herbarium, Flora et Scientia), Paraná: Scientia et Labor, 1987.

Santos VR, Gomes RT, Oliveira RR, Cortés ME, Brandão MGL. Susceptibility of oral pathogenic microorganisms to aqueous and ethanolic extracts of *Stryphnodendron adstringens* (barbatimão). *Int J Dent.* 2009;8(1):1-5.

Sasaki H, Takei M, Kobayashi M, Pollard RB, Suzuki F. Effect of glycyrrhizin, an active component of licorice roots, on HIV replication in cultures of peripheral blood mononuclear cells from HIV-seropositive patients. *Pathobiology*. 2002;70:229-36.

Schenckel EP, Gosmann G, Petrovick PR. Produtos de origem vegetal e o desenvolvimento de medicamentos. In: Simões CMO, Schenckel EP, Gosmann GM, Melo JCP, Mentz LA, Petrovick PR, orgs. *Farmacognosia: da planta ao medicamento*. Porto Alegre/Florianópolis: Editora da Universidade UFRGS / Editora da UFSC; 2001. p. 301-332.

Schmalz G, Schuster U, Koch A, Schweikl H. Cytotoxicity of low pH dentin-bonding agents in a dentin barrier test *in vitro*. *J Endod*. 2002;28(3):188-92.

Sheeja K, Kuttan G. *Andrographis paniculata* downregulates proinflammatory cytokine production and augments cell mediated immune response in metastatic tumor-bearing mice. *Asian Pacific J Cancer Prev*. 2010;11:723-9.

Shibata S. A drug over the millennia: pharmacognosy, chemistry and pharmacology of licorice. *Yakugaku Zasshi*. 2000;120:849-62.

Shih MF, Cheng YD, Shen CR, Cherng JY. A molecular pharmacology study into the anti-inflammatory actions of *Euphorbia hirta* L. on the LPS-induced RAW 264.7 cells through selective iNOS protein inhibition. *J Nat Med*. 2010;64:330-5.

Shin YW, Bae EA, Lee B, Lee SH, Kim JA, Kim YS, et al. *In vitro* and *in vivo* antiallergic effects of *Glycyrrhiza glabra* L. and its components. *Planta Med*. 2007;73:257-6.

Silva SL, Chaar JS, Figueiredo PMS, Yano T. Cytotoxic evaluation of essential oil from *Casearia sylvestris* Sw on human cancer cells and erythrocytes. *Acta Amazonica*. 2008;38(1):107-12.

Smith AJ, Jackson MS, Bagg J. The ecology of *Staphylococcus* species in the oral cavity. *J Med Microbiol*. 2001;50(11):940-6.

Smith TL, Jarvis WR. Antimicrobial resistance in *Staphylococcus aureus*. *Microbes infect.* 1999;1:795-805.

Sorsa T, Tjaderhane L, Salo T. Matrix metalloproteinases (MMPs) in oral diseases. *Oral Dis.* 2004;10:311-8.

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 este extrato. *Rev Bras Farmacogn.* 2007;17(1):71-5.

Stashenko P, Teles R, D'Souza R. Periapical inflammatory responses and their modulation. *Crit Rev Oral Biol Med.* 1998;9(4):498-521.

Stewart PS, Costerton JW. Antibiotic resistance of bacteria in biofilms. *Lancet.* 2001;358 (9276):135-8.

Takahashi K. Microbiological, pathological, inflammatory, immunological and molecular biological aspects of periradicular disease. *Int Endod J.* 1998;31(5):311-25.

Takino Y, Koshioka M, Shiokawa M, Ishii Y, Maruyama S, Higashino M, et al. Quantitative determination of glycyrrhizic acid in liquorice roots and extracts by TLC-ensitometry. *Planta Med.* 1979;36(1):74–8.

Tanigushi M, Kubo I. Ethnobotanical drug discovery based on medicine men's trails in the African savanna: screening of east African plants for antimicrobial activity II. *J Nat Prod.* 1993;56:1539-46.

Tenover F, Gorwitz RJ. The epidemiology of *Staphylococcus* infections. In: Fischetti VA, Novick RP, Ferretti JJ, Portnoy DA, Rood JI, editors. *Gram-positive pathogens*. 2nd ed. Washington, DC: American Society for Microbiology; 2006. p. 526-34.

Tepe B, Daferera D, Sokmen M, Polissiou M, Sokmen A. *In vitro* antimicrobial and antioxidant activities of the essential oils and various extracts of *Thymus eigii* M Zohary et P.H. Davis. J Agric Food Chem. 2004;52:1132–1137.

Tortora GJ, Funke BR, Case CL. Microbiologia. 8. ed. Porto Alegre: Artmed; 2005.

Trabulsi LR, Alterthum F. Microbiologia. 5. ed. São Paulo: Atheneu; 2008.

Trouillas P, Calliste CA, Allais DP. Antioxidant, antiinflammatory and antiproliferative properties of sixteen water plant extracts used in the Limousin countryside as herbal teas. Food Chem. 2003;80:399–407.

Turolla MSR. Avaliação dos aspectos toxicológicos dos fitoterápicos: um estudo comparativo [dissertação]. São Paulo: Faculdade de Ciências Farmacêuticas: Universidade de São Paulo - USP; 2004.

Tyler VE. Natural products and medicine: an overview. In: Balick MJ, Elisabetsky E, Laird AS, editors. Medicinal resources of the tropical forest, biodiversity and its importance to human health. New York: Columbia University Press; 1996. p. 3-10.

Unlu M, Ergene E, Unlu GV, Zeytinoglu HS, Vural N. Composition, antimicrobial activity and in vitro cytotoxicity of essential oil from *Cinnamomum zeylanicum* Blume (Lauraceae). Food Chem Toxicol. 2010;48:3274-80.

Vandenesch F, Naimi T, Enright MC, Lina G, Nimmo GR, Heffernan H, et al. Community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* carrying Panton-Valentine leukocidin genes: worldwide emergence. Emerg Infect Dis. 2003;9:978–84.

Vasconcelos LCS, Sampaio FC, Sampaio MCC, Pereira MSV, Higino JS, Peixoto MHP. Minimum inhibitory concentration of adherence of *Punica granatum* Linn (pomegranate) gel against *S. mutans*, *S. mitis* and *C. albicans*. Braz Dent J. 2006;17(3):223-7.

Voravuthikunchai S, Sririrak T, Limsuwan S, Supawita T, Iida T, Honda T. Inhibitory effects of active compounds from *Punica granatum* pericarp on verocytotoxin production by enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157: H7. J Health Sci. 2005;51:590–6.

Vuong OMC. *Staphylococcus epidermidis* infections. Microbiol Infect. 2002; 4:481-9.

Warren JR, Marshall BJ. Unidentified curved bacilli on gastric epithelium in chronic active gastritis. Lancet. 1983;1:1273–5.

Watkins LR, Maier SF, Goehler LE. Cytokine-to-brain communication: A review & analysis of alternative mechanisms. Life Sci. 1995;57:1011-26.

Wittschier N, Faller G, Hensel A. Aqueous extracts and polysaccharides from liquorice roots (*Glycyrrhiza glabra* L.) inhibit adhesion of *Helicobacter pylori* to human gastric mucosa. J Ethnopharmacol. 2009;125:218-23.

Xu Z, Huang CX, Li Y, Wang PZ, Ren GL, Chen CS. Toll-like receptor 4 siRNA attenuates LPS-induced secretion of inflammatory cytokines and chemokines by macrophages. J Infect. 2007;55(1):1-9.

Yamamoto T, Nishiyama A, Takano T, Yabe S, Higuchi W, Razvina O, et al. Community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: community transmission, pathogenesis, and drug resistance. J Infect Chemother. 2009;16(4):225-54.

Yan R, Yang Y, Zeng Y, Zou G. Cytotoxicity and antibacterial activity of *Lindera strychnifolia* essential oils and extracts. J Ethnopharmacol. 2009;121:451-5.

Yang EJ, Yim EY, Song G, Kim GO, Hyun CG. Inhibition of nitric oxide production in lipopolysaccharide-activated RAW 264.7 macrophages by Jeju plant extracts. Interdisc Toxicol. 2009; 2(4):245–9.

Yin J, Kwon GJ, Wang MH. The antioxidant and cytotoxic activities of *Sonchus oleraceus* L. extracts. *Nutr Res*. 2007;1(3):189-194.

Yoon SB, Lee YJ, Park SK, Kim HC, Bae H, Kim HM, et al. Anti-inflammatory effects of *Scutellaria baicalensis* water extract on LPS-activated RAW 264.7 macrophages. *J Ethnopharmacol*. 2009;125:286-90.

Zanin ICJ, Lobo MM, Rodrigues LK, Pimenta LA, Hofling JF, Gonçalves RB. Photosensitization of in vitro biofilms by toluidine blue combined with light-emitting diode. *Eur J Oral Sci*. 2006;114(1):64-9.

Zetola N, Francis JS, Nuermberger EL, Bishai WR. Community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: an emerging threat. *Lancet Infect Dis*. 2005;5:275–86.

ANEXO A – Certificado do Comitê de Ética em Pesquisa

  **UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA**
CAMPUS DE SÃO JOSÉ DOS CAMPOS
FACULDADE DE ODONTOLOGIA
Av. Eng. Francisco José Longu, 777 – Jd. São Dimas
CEP 12201-970 – F. (12) 3947-9028 / 9037
Fax: (12) 3947-9010 / ainotti@fosjo.unesp.br / Guodca@fosjo.unesp.br



CERTIFICADO
Comitê de Ética em Pesquisa
Envolvendo Animais

CERTIFICAMOS, que o protocolo nº 008/2010-PA/CEP, sobre “**Avaliação da atividade antimicrobiana de extratos naturais sob cepas-padrão de Staphylococcus aureus, Streptococcus spp. e Candida spp. e ensaio de citotoxicidade**” sob responsabilidade de **JONATAS RAFAEL DE OLIVEIRA**, está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotado pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA) e foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa.

São José dos Campos, 10 de março de 2010

Profa.Titular YASMIN RODARTE CARVALHO
Coordenadora

ANEXO B – Alteração do título junto ao Comitê de Ética em Pesquisa



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
CAMPUS DE SÃO JOSÉ DOS CAMPOS
FACULDADE DE ODONTOLOGIA

Av. Eng. Manoel de Araújo, 113 - Jd. Santa Helena - 13.081-000 - São José dos Campos - SP



Comitê de Ética em Pesquisa
Envolvendo Animais

São José dos Campos, 13 de abril de 2011

Ofício nº 04/10-CEP

Prezado(a) Sr.(a)	JONATAS RAFAEL DE OLIVEIRA
Projeto	Avaliação da atividade antimicrobiana de extratos naturais sob cepas-padrão de <i>Staphylococcus aureus</i> , <i>Streptococcus</i> spp. e <i>Candida</i> spp. e ensaio de citotoxicidade
PARECER	
Por solicitação do Pesquisador, foi alterado o título do Projeto acima mencionado, para "Ensaio de citotoxicidade de extratos naturais após determinação da concentração microbicida mínima para <i>Staphylococcus</i> spp., <i>Streptococcus mutans</i> e <i>Candida</i> spp." Convalidando dessa forma o Protocolo nº 008/2010-PA/CEP de 10/03/2010.	

Atenciosamente,

Profa. Titular YASMIN RODARTE CARVALHO
Coordenadora