



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
Câmpus de Araçatuba

RAFAELA LARUZO RABELO

**Atividade antimicrobiana e antibiofilme de flavonóis
como agentes para aplicação endodôntica**

**Araçatuba
2018**

RAFAELA LARUZO RABELO

**Atividade antimicrobiana e antibiofilme de flavonóis
como agentes para aplicação endodôntica**

Trabalho de conclusão de curso
apresentado à Faculdade de Odontologia
de Araçatuba da Universidade Estadual
Paulista “Júlio de Mesquita Filho” –
UNESP como parte dos requisitos para a
obtenção do título de Cirurgião-Dentista.

Orientadora: Profa. Dra. Cristiane Duque

**Araçatuba
2018**

*À minha família, meus pais Magno Rabelo e
Tânia Aparecida Mariano, e meus irmãos Amanda
Laruzo Rabelo e Gabriel Laruzo Rabelo, com gratidão
por todo apoio recebido durante esta trajetória.*

AGRADECIMENTOS

A **Deus**, por todas as bênçãos já concedidas e por me guiar em tudo que faço em minha vida, me dando força e coragem para nunca desistir dos meus sonhos.

Aos meu pais, **Magno Rabelo e Tânia Aparecida Mariano**, por não medirem esforços na realização dessa etapa da minha vida, vocês sempre fazem o possível e o impossível para que tudo dê certo. Só quero poder retribuir todas as coisas maravilhosas que já fizeram por mim, pelas quais serei eternamente grata. Sei que tudo isso só foi possível com o apoio e dedicação de vocês. Obrigada por me ensinarem coisas que a vida jamais seria capaz de me ensinar sozinha, vocês são meu maior exemplo, e o meu amor por vocês é imenso.

Aos meus irmãos, **Amanda Laruzo Rabelo e Gabriel Laruzo Rabelo**, por comporem comigo essa família abençoada. Obrigada por todo apoio e por serem as pessoas que mais confio. Eu amo vocês e sinto falta dos nossos momentos, sejam eles tranquilos ou briguentos.

Aos meu avós, **Divina Rabelo, Luís da Costa Silva Rabelo, Nilza Bernardes Mariano e Tercio Mariano de Rezende** (*in memoriam*), por todo carinho, amor e confiança que sempre tiveram por mim. Sinto muitas saudades de vocês o tempo todo, é sempre muito bom voltar pra casa e renovar as energias ao lado de vocês.

À minha querida professora orientadora, **Profa. Dra. Cristiane Duque**, pela orientação e por todo o conhecimento passado para que eu concluísse este projeto. Obrigada por ter confiado na minha capacidade para ser sua orientada me abrindo as portas para a pesquisa, a qual me fez tomar gosto pelo meio científico. Tenho uma admiração enorme pela senhora, tanto pessoalmente quanto profissionalmente, sendo uma pessoa de grande exemplo pra mim. Agradeço por sempre estar disponível com seu jeito carismático para sanar minhas dúvidas e obrigada por toda prestatividade.

Ao professor, **Dr. Wirley Gonçalves Assunção**, por ter me orientado em diversos trabalhos e pela disponibilidade em avaliar este meu trabalho, contribuindo para minha formação. Tive experiências incríveis com o senhor em que pude aprender bastante, serei sempre grata.

À doutoranda **Karina Sampaio Caiaffa**, por além de compor a banca avaliadora, ter sido peça fundamental na elaboração deste trabalho. Obrigada por toda ajuda, desde no laboratório ou respondendo qualquer dúvida minha, sempre bem alto astral e com um sorriso no rosto.

Ao **Jesse Augusto Pereira, Vanessa Rodrigues dos Santos e Thainara de Oliveira Assumpção** que foram essenciais para o desenvolvimento deste projeto. Obrigado por me acompanharem, mesmo em finais de semana, em cada passo sem pestanejar para que conseguíssemos finalizar este trabalho. Desejo a vocês todo o sucesso e felicidade que a vida possa lhes oferecer.

A **Laís Kataoka e Maria Juliana Morabito**, minhas fiéis companheiras desde o primeiro ano. Com vocês, com certeza esse caminho foi mais fácil, e fico abismada no tanto que essa amizade deu certo. Obrigada por cada instante que passamos juntas, amei ter colecionado histórias com vocês, quero tê-las comigo para sempre.

Ao meu irmão de coração, **Allan Oliveira**. Você é um exemplo para mim de determinação e companheirismo. Adoro aprender com você, e o seu altruísmo é de grande admiração. Obrigada por estar sempre comigo, me alegrando, chorando junto comigo, estudando, festando... Você marcou minha graduação.

Ao meu namorado, **Heitor Pinhata Cecílio**, obrigada por ter entrado em minha vida, e não me canso de dizer que você otimizou-la só de estar ao meu lado. Você é meu maior companheiro e que nunca mede esforços para me ajudar, obrigada por toda ajuda, amor e confiança. A nossa história construída na graduação é só começo.

A **Surubateria**, por me proporcionar experiências inesquecíveis e a oportunidade de construir grandes amizades. Amigos estes que juntos pudemos trabalhar em equipe, desenvolver habilidades e descontrair no final do dia, aliviando os momentos de tensão. Agradeço a cada membro pela oportunidade e confiança de terem me encarregado o cargo de mestre por dois anos, sinto-me muito honrada e tenho um enorme orgulho em fazer parte dessa instituição.

Ao grupo **PET Odonto FOA**, instituição que me proporcionou um grande crescimento pessoal e acadêmico, durante quatro anos. Em que ao

lado de amigos, em especial o ex-tutor Profº Dr. Elói Dezan Junior e o tutor Profº Dr. Leonardo Faverani, estivemos sempre a procura de uma graduação melhor e que puderam me doar variados conhecimentos, seja nas reuniões ou nos eventos.

A minha grande amiga, **Karoline Silva**, que pude compartilhar experiências de pertinho por morarmos juntas por três anos. Agradeço muito pela sua amizade e por sempre estar disposta a me ajudar, seja me emprestando algum material seja estendendo minha roupa no varal.

A **Adriane Chiorlin, Cecília Alves, Fernanda Ribeiro e Giovanna Cunha**, pelos momentos inesquecíveis na pensão e que de lá, vocês se tornaram minhas grandes amigas.

A **Anna Clara Mendes, Danielle Almeida e Letícia Bizzi**, minhas companheiras de apartamento, obrigada por cada momento único.

A **Maria Cleusa Montovanelli Pinhata, Rosana de Fátima Pinhata e Márcia Cristina Pinhata**, por terem aberto as portas de sua casa para mim de um modo tão acolhedor. Vocês com certeza me fazem sentir mais perto de casa, sendo a minha segunda família. Sou muito grata a vocês.

Aos amigos que a Unesp me proporcionou ao longo desses anos, **Ana Carolina Calixto, Aretuza, Arthur Lacerda, Brena Dartine, Bruno Souza Castro, Caio Vendrame, Caroline de Freitas, Fernanda Zabatiero, Gabriel Nunes, Júlia Guaraldo, Letícia Gonçalves, Lourenço Canevari, Luanna Gonçalves, Luis Felipe Pupim, Maria Beatriz Taborda, Mateus Sampaio, Paulo Penitente, Rafael Rios, Thaís Genesini, Thales Tanganini, Vitor Santana** e a todos que estiveram comigo nesses anos, por terem feito desse meu período na faculdade os melhores anos da minha vida.

À **turma LX de Odontologia**, obrigada pelos amigos que fiz nessa longa jornada acadêmica e pelos momentos memoráveis de nossa turma.

À **Faculdade de Odontologia de Araçatuba – UNESP** dirigida pelo Prof. Dr. Wilson Roberto Poi, por oferecer não só a estrutura, mas também professores e funcionários sempre dispostos a ensinar, ajudar e nos apoiar no que fosse necessário para que por fim me graduasse em Odontologia.

À **disciplina de Odontopediatria** e ao **Departamento de Odontologia Infantil e Social** da Faculdade de Odontologia de Araçatuba, Universidade do Estado de São Paulo - UNESP, Araçatuba, São Paulo, Brasil.

Ao **Programa Institucional de Bolsas de Iniciação Científica (PIBIC)** por ter me concedido bolsa de iniciação científica para a execução deste trabalho.

Aos **pacientes**, agradeço por depositarem tanta confiança em meu trabalho mesmo sabendo de minha inexperiência, graças a vocês adquiri experiências e sabedoria não só pela parte prática da odontologia, mas também a como lidar com o ser humano. Vocês foram fundamentais para que eu hoje me tornasse cirurgiã-dentista.

A **todos os professores** pelos ensinamentos que foram ministrados e pela dedicação, contribuindo para minha formação profissional.

E a **todos aqueles que, de alguma forma contribuíram para a elaboração e conclusão deste trabalho,**

Minha eterna gratidão.

"Que os vossos esforços desafiem as impossibilidades, lembrai-vos de que as grandes coisas do homem foram conquistadas do que parecia impossível."

Charles Chaplin

RABELO, RL. **Atividade antimicrobiana e antibiofilme de flavonóis como agentes para aplicação endodôntica**. 2018. 46f. Trabalho de Conclusão de Curso – Faculdade de Odontologia de Araçatuba, Universidade Estadual Paulista, Araçatuba, 2018.

RESUMO

Mesmo após o tratamento endodôntico, em dentes permanentes com ápice aberto ou fechado, infecções refratárias podem se desenvolver devido à persistência ou invasão de novos microrganismos patogênicos. Muitos autores têm explorado o uso de fitoterápicos, visando obter novos compostos que apresentem propriedades terapêuticas, como os flavonoides. Uma importante classe dos flavonoides é a dos flavonóis, caracterizados por um esqueleto químico de 3-hidroxi-flavona, que pode estar ou não glicosilada (ou ligada a um açúcar). Eles estão presentes em frutas e vegetais e apresentam diversas propriedades, como ação antimicrobiana, antioxidante, osteogênica e antiosteoclastogênica. Sendo assim o objetivo de presente estudo foi analisar a atividade antimicrobiana e antibiofilme de flavonóis como agentes para aplicação endodôntica. Os seguintes flavonóis: miricetina, canferol, quercetina e galangina foram avaliados contra *Streptococcus mutans*, *Enterococcus faecalis*, *Actinomyces israelii*, *Lactobacillus casei*, *Fusobacterium nucleatum* e *Candida albicans* em cultura planctônica e em biofilme de 48h, em placas de poliestireno, após 24h de tratamento. Os resultados mostraram valores de CIM/CBM variando entre 0,03 e 2 mg/mL. Canferol e quercetina não apresentaram efeito contra nenhum microrganismo testado. Galangina reduziu o crescimento de *C. albicans* e *A. israelii*, e miricetina teve ação bactericida contra *S. mutans*, *E. faecalis*, *A. israelii*, *L. casei* e *F. nucleatum*. Quanto à ação antibiofilme, galangina reduziu significativamente biofilme de *C. albicans* e de *A. israelii*. Miricetina eliminou biofilme de *S. mutans* e *E. faecalis* e reduziu biofilme de *A. israelii*, *L. casei* e *F. nucleatum*. Conclui-se que, entre os flavonóis testados, a miricetina teve o melhor efeito antimicrobiano e antibiofilme contra microrganismos associados com infecção endodôntica.

Palavras-chave: Flavonoides. Atividade Antimicrobiana. Biofilmes

RABELO, RL. **Antimicrobial and antibiofilm activity of flavonols as agents for endodontic application.** 2018. 46f. Trabalho de Conclusão de Curso – Faculdade de Odontologia de Araçatuba, Universidade Estadual Paulista, Araçatuba, 2018.

ABSTRACT

Even after endodontic treatment, in permanent teeth with open apex or closed, refractory infections may develop due to the persistence or invasion of new pathogenic microorganisms. Many authors have explored the use of phytotherapies in order to obtain new compounds that have therapeutic properties, such as flavonoids. An important class of flavonoids is the flavonols, characterized by a chemical skeleton of 3-hydroxyflavone, which may or may not be glycosylated (or bound to a sugar). They are present in fruits and vegetables and have several properties, such as antimicrobial, antioxidant, osteogenic and antiosteoclastogenic properties. Therefore, the objective of this study is to analyze the antimicrobial and antibiofilm activity of flavonols as agents for endodontic application. The following flavonols: myricetin, kaempferol, quercetin and galangin were evaluated against *Streptococcus mutans*, *Enterococcus faecalis*, *Lactobacillus casei*, *Actinomyces israelii*, *Fusobacterium nucleatum* and *Candida albicans* in planktonic culture and 48 hours biofilm in polystyrene plates, after 24 hours of treatment. The results showed MIC/MBC values ranging from 0.03 to 2 mg/mL. Kaempferol and quercetin had no effect against any tested microorganism. Galangin reduced the growth of *C. albicans* and *A. israelii*, and myricetin had bactericidal action against *S. mutans*, *A. israelii*, *L. casei* and *F. nucleatum*. For the antibiofilm action, galangin significantly reduced biofilm of *C. albicans* and *A. israelii*. Myricetin eliminated *S. mutans* and *E. faecalis* biofilms and reduced *A. israelii*, *L. casei* and *F. nucleatum* biofilms. It is concluded that, among the flavonols tested, myricetin had the best antimicrobial and antibiotic effects against microorganisms associated with endodontic infection.

Keywords: Flavonoids. Antimicrobial Activity. Biofilms.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Fórmula molecular da quercetina	18
Figura 2 - Fórmula molecular da miricetina	20
Figura 3 - Fórmula molecular do canferol	22
Figura 4 - Fórmula molecular da galangina	24
Figura 5 - Efeito da miricetina e CHX sobre o biofilme de <i>S. mutans</i>	30
Figura 6 - Efeito da miricetina e CHX sobre o biofilme de <i>E. faecalis</i>	31
Figura 7 - Efeito da miricetina, galangina e CHX sobre o biofilme de <i>A. israelii</i>	31
Figura 8 - Efeito da miricetina e CHX sobre o biofilme de <i>L. casei</i>	32
Figura 9 - Efeito da miricetina e CHX sobre o biofilme de <i>F. nucleatum</i>	32
Figura 10 - Efeito da galangina e anfotericina sobre o biofilme de <i>C. albicans</i>	33

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Valores de CIM e CBM/CFM (em mg/mL) para os compostos contra os microrganismos avaliados	29
---	----

LISTA DE ABREVIATURAS

<i>A. israelii</i>	<i>Actinomyces israelii</i>
<i>A. odontolyticus</i>	<i>Actinomyces odontolyticus</i>
<i>B. subtilis</i>	<i>Bacillus subtilis</i>
BHI	Brain Heart Infusion
BHIA	Brain Heart Infusion Agar
<i>C. albicans</i>	<i>Candida albicans</i>
CBM	Concentração bactericida mínima
CFM	Concentração fungicida mínima
CHX	Clorexidina
CIM	Concentração inibitória mínima
CLSI	Clinical and Laboratory Standards Institute
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
<i>E. faecium</i>	<i>Enterococcus faecium</i>
<i>F. nucleatum</i>	<i>Fusobacterium nucleatum</i>
FIOCRUZ	Fundação Oswaldo Cruz
GAL	Galangina
<i>K. pneumonia</i>	<i>Klebsiella pneumonia</i>
<i>L. casei</i>	<i>Lactobacillus casei</i>
LPS	Lipopolissacarídeo
MDA	Malonaldeído
MH	Mueller-Hinton
MHA	Mueller-Hinton Agar
MIR	Miricetina
<i>P. aeruginosa</i>	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
<i>P. gingivalis</i>	<i>Porphyromonas gingivalis</i>
<i>P. mirabilis</i>	<i>Proteus mirabilis</i>
<i>P. vulgaris</i>	<i>Proteus vulgaris</i>
PMFs	Polimetoxiladas
QQ	Quercetina-quinona
<i>S. aureus</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>
<i>S. dysenteriae</i>	<i>Shigella dysenteriae</i>

<i>S. epidermidis</i>	<i>Staphylococcus epidermidis</i>
<i>S. flexneriae</i>	<i>Shigella flexneriae</i>
<i>S. mutans</i>	<i>Streptococcus mutans</i>
<i>S. paratyphi</i>	<i>Salmonella paratyphi</i>
<i>S. pyogenes</i>	<i>Streptococcus pyogenes</i>
<i>S. saprophyticus</i>	<i>Staphylococcus saprophyticus</i>
<i>S. sonneie</i>	<i>Shigella sonneie</i>
<i>S. typhi</i>	<i>Salmonella enterica sorovar Typhi</i>
SDA	Sabouraud Dextrose Agar
UFC	Unidades formadoras de colônia

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	16
2 REVISÃO DE LITERATURA	18
2.1 Quercetina.....	18
2.2 Miricetina	20
2.3 Canferol.....	22
2.4 Galangina	24
3 OBJETIVO.....	25
4 MATERIAL E MÉTODOS	26
4.1 Flavonois e Controles.....	26
4.2 Cepas microbianas e condições de crescimento	26
4.3 Análise da atividade antimicrobiana em cultura planctônica	26
4.3.1 Ensaio de CIM (concentração inibitória mínima) e CBM/CFM (concentração bactericida/fungicida mínima)	27
4.4 Análise da atividade antimicrobiana em biofilme.....	27
4.4.1 Efeito dos flavonois sobre o biofilme formado em microplacas	27
4.5 Análise estatística	28
5 RESULTADOS	29
5.1 Análise da atividade antimicrobiana em cultura planctônica	29
5.1.1 Ensaio de CIM (concentração inibitória mínima) e CBM/CFM (concentração bactericida/fungicida mínima)	29
5.2 Análise da atividade antimicrobiana em biofilme.....	30
5.2.1 Efeito dos flavonoides sobre o biofilme formado em microplacas	30
6 DISCUSSÃO	34
7 CONCLUSÃO.....	37
Referências	38

1 INTRODUÇÃO

O preparo químico-mecânico pelos métodos convencionais de tratamento endodôntico leva a uma substancial redução na quantidade e diversidade de microrganismos, entretanto, não permite a desinfecção do sistema de canais radiculares e microrganismos podem ser recuperados ao final do tratamento ou entre as sessões (Chávez de Paz et al., 2003). Muitos estudos têm revelado que as bactérias Gram-positivas anaeróbias facultativas são mais frequentes nesses casos, incluindo *Streptococcus spp.*, *Actinomyces spp.* (*A. israelii* e *A. odontolyticus*), *Propionibacterium spp.*, *Lactobacilos spp.*, *Enterococcus faecalis*, entre outros (Siqueira e Rôças, 2009). Sakamoto et al. (2008) detectaram 11 espécies comuns entre os casos de necessidade de retratamento, dentre elas, *Enterococcus faecalis*, *Pseudomonas aeruginosa* e o fungo *Candida albicans*.

Além disso, soluções irrigadoras comuns, tais como o hipoclorito de sódio e a digluconato de clorexidina (CHX), são citotóxicos para as células pulpares remanescentes, no caso de dentes permanentes jovens com o ápice aberto, impedindo sua aderência às superfícies dos canais radiculares e subsequente síntese de dentina (Ring et al., 2008). Alguns medicamentos intracanaís também possuem diversas desvantagens, como resistência, citotoxicidade e imunogenicidade. O hidróxido de cálcio causa resposta inflamatória na polpa (Heys et al., 1981); o paramonoclorofenol canforado possui exacerbado efeito citotóxico (Filho et al., 2007); o formaldeído, utilizado como formocresol, é altamente tóxico, mutagênico e carcinogênico (Lewis et al., 1981); e os antibióticos causam resistência bacteriana (Cohen, 2000).

Muitos autores têm explorado o uso de fitoterápicos, visando obter novos compostos que apresentem propriedades terapêuticas, como os flavonoides. Estes são compostos fenólicos naturais que estão presentes em frutas e vegetais (Panche et al., 2016) e vem apresentando diversas propriedades, como antimicrobiana, antioxidante, osteogênica e antiosteoclastogênica (Pietta, 2000; Tripoli et al., 2007; Sharan et al., 2009; Pilsakova et al., 2010; Domitrovic, 2011). Eles apresentam estrutura química comum, sendo constituídos por dois anéis aromáticos (A e B) unidos por três carbonos que formam um anel heterocíclico, denominado de anel C. De acordo

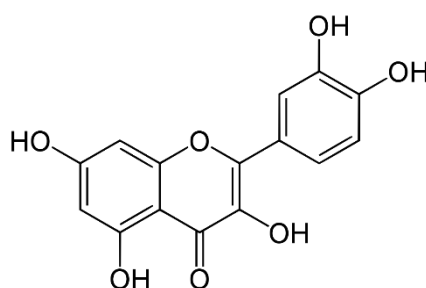
com as variações no anel C, os flavonoides são divididos em seis classes principais: flavonóis, flavonas, flavanonas, flavanóis (ou catequinas), isoflavonoides e antocianidinas. Substituições dos anéis A e B originam diferentes compostos dentro de cada classe de flavonoides (Cushnie e Lamb, 2005). Uma importante classe dos flavonoides é a dos flavonóis, caracterizados por um esqueleto químico de 3-hidroxiavona, que pode estar ou não glicosilada (ou ligada a um açúcar) (Cushnie e Lamb, 2005). Eles estão presentes em frutas e vegetais e apresentam atividades já citadas previamente, como antimicrobiana, antioxidante, osteogênica e antiosteoclastogênica. Dentre os flavonóis, são muito estudados a quercetina, miricetina, canferol e galangina. Entretanto, existem poucos trabalhos sobre os efeitos antimicrobianos de flavonoides sobre bactérias de interesse endodôntico, justificando a necessidade de estudos nessa linha de pesquisa, principalmente pelo caráter natural dos compostos e, portanto, maior disponibilidade, baixo potencial citotóxico e menor possibilidade de resistência microbiana. Futuramente, os flavonoides poderiam ser incorporados em pastas ou cimentos endodônticos como material curativo para o tratamento das pulpites irreversíveis em dentes permanentes jovens.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 QUERCETINA

A quercetina (3,5,7,3'-4'-pentahidroxi flavona), membro da classe dos flavonóis, contém cinco grupos hidroxila nas posições 3, 5, 7, 30, 40 e um grupo carbonila na quarta posição (Mittal et al., 2014). Dentre os flavonoides, ela é que mais está presente na dieta humana, variando seu consumo diário entre 50 e 500mg (Deschner et al., 1991), e representando 95% do total dos flavonoides ingeridos (Nijveldt et al., 2001). Como alimentos mais ricos em quercetina, temos cebolas, maçãs, chá e vinho tinto (Russo et al., 2012).

Figura 1. Fórmula molecular da quercetina



Fonte: site da Sigma-Aldrich

A ingestão da quercetina consiste na sua forma glicosada, em que ela está ligada a um ou dois resíduos de glicose (quercetina glicosídeos) ou à rutinose (quercetina rutinosídeo) (Mitchell et al., 2007). E sabe-se que a eficiência de sua absorção é influenciada pela natureza da glicosilação (Crespy et al., 1999), sendo que a conversão da quercetina rutinosídeo em glicosídeo é uma estratégia importante para aumentar a sua biodisponibilidade nos alimentos (Olthof et al., 2000).

A quercetina é considerada um forte antioxidante devido à sua capacidade de eliminar os radicais livres, provinda da presença de dois farmacóforos antioxidantes (grupo catecol no anel B e o grupo OH na posição 3 do anel A) (Heijnen et al., 2002) e ligar íons de metal de transição (de Souza et al., 2004). De qualquer forma, como muitos compostos antioxidantes, a quercetina pode mostrar atividade pró-oxidante, pelo menos em algumas circunstâncias. Isso acontece porque a quercetina-quinona (QQ), o principal produto de oxidação da quercetina, reage fortemente com os tióis, causando a

perda da função da proteína. Essa toxicidade induzida por QQ foi demonstrada em vários estudos *in vitro* e foi recentemente definida como o paradoxo da quercetina, isto é, ao mesmo tempo em que oferece proteção pela eliminação de espécies reativas de oxigênio, a quercetina é convertida em um produto potencialmente tóxico (Boots et al., 2007).

Ao eliminar os radicais livres, a quercetina também pode reduzir a inflamação (Shoskes et al., 1999). Alguns estudos mostraram que os flavonóides quercetina e catequina inibiram três aspectos da função de neutrófilos humanos *in vitro*, que são considerados por contribuir para o processo inflamatório: a liberação de enzimas lisossomais, a resposta à quimioluminescência e a produção de radicais livres (Tijburg et al., 1997; Rao et al., 2005). Em suma, existem vários estudos que confirmam o potencial anti-inflamatório da quercetina, principalmente ao inibir o metabolismo de ácido araquidônico e a produção de eicosanóides, que são potentes mediadores inflamatórios (de Pascual-Teresa et al., 2004; During et al., 2013).

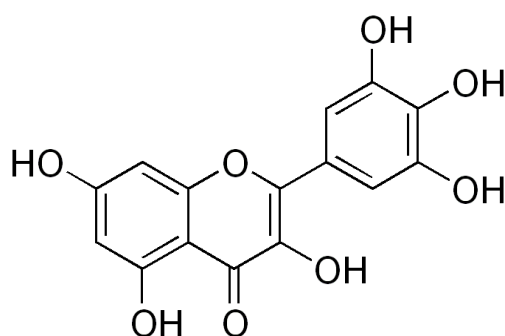
Já em relação à sua ação antimicrobiana, no estudo de Jaisinghani (2017), a quercetina foi testada contra *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Shigella flexneri*, *Proteus vulgaris*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Lactobacillus casei* var. *shirota*. Teve concentração inibitória mínima (CIM) para *S. aureus*, *P. aeruginosa* na concentração de 20 µg/mL enquanto *P. vulgaris* e *E. coli* foram inibidas nas concentrações de 300 µg/mL e 400 µg/mL, respectivamente. *Shigella flexneri* e *Lactobacillus casei* var. *shirota* foram completamente indiferentes mesmo na concentração de 500 µg/mL. Mirzoeva e colaboradores (1997) mostraram que a quercetina causa um aumento na permeabilidade da membrana bacteriana e uma dissipação do potencial de membrana.

Além disso, no trabalho de Rauha e colaboradores (2000), em que foi feita uma triagem antimicrobiana de 13 substâncias fenólicas contra *Aspergillus niger*, *Bacillus subtilis*, *Candida albicans*, *Escherichia coli*, *Micrococcus luteus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Staphylococcus aureus* e *Staphylococcus epidermidis*, os flavonóides quercetina e naringenina inibiram o crescimento desses organismos.

2.2 MIRICETINA

A miricetina (MIR) é um flavonol que contém hidroxilas nas posições dos carbonos 3, 5, 7, 3', 4' e 5' (Wollenweber E., 1982). Encontra-se presente em diversos vegetais, bagas e frutas, principalmente na forma de glicosídeos, ao invés de agliconas livres. (Canada A. T., 1990; Koeppen e Herrmann, 1977). Algumas bebidas, como chá e vinho tinto, também a possuem em sua composição (Hertog et al., 1993; Kühnau J, 1976).

Figura 2. Fórmula molecular da miricetina



Fonte: site da Sigma-Aldrich

Atividades antimicrobianas, antiviróticas, antitrombóticas, e, antiateroscleróticas, bem como efeitos antioxidantes e pró-oxidantes foram relatadas para a miricetina (Ong e Khoo, 1997).

A miricetina exerce efeitos anti-inflamatórios e imunomoduladores, como evidenciado na supressão da síntese de fator de necrose tumoral (TNF)- α , interleucina (IL)-6 e IL-12p70 por células dendríticas estimuladas por lipopolissacarídeos (LPS) e macrófagos (Ko, 2012; Fu et al., 2013); na redução da secreção de citocinas e histaminas pró-inflamatórias por mastócitos (Park et al., 2008) e no aumento da produção de interleucina IL-10 anti-inflamatória por macrófagos (Ferreira et al., 2013). A inibição do fator nuclear de transcrição κB também está intimamente relacionada ao seu efeito anti-inflamatório (Park et al., 2008; Ko, 2012; Ferreira et al., 2013; Fu et al., 2013).

Outros efeitos biológicos da miricetina compreendem efeitos antidiabéticos via atenuação da hiperglicemia e regulação do metabolismo do glicogênio (Ong e Khoo, 2000); efeitos antitumorais obtidos através da quimioprevenção e da inibição do crescimento de células cancerígenas

(Kumamoto et al., 2009; Maggioni et al., 2014), e ação analgésica devido à modulação da atividade dos canais de cálcio nos neurônios (Hagenacker et al., 2010).

Quanto a sua ação antioxidante, foi relatado também que a miricetina é eficaz na remoção de radicais gerados por sistemas enzimáticos e não enzimáticos. O malonaldeído (MDA) é produzido quando os lipídios sofrem peroxidação e é frequentemente usado como indicador de peroxidação lipídica não enzimática (Ong e Khoo, 1997). A miricetina inibiu a formação de MDA do ácido araquidônico (Robak et al., 1986) em microssomas hepáticos de ratos (Robak e Gryglewski, 1988) e a formação de MDA estimulada por ascorbato em lipídios hepáticos (Robak et al., 1988).

A miricetina atuando como agente antiviral está relacionada a sua capacidade de inibir a transcriptase reversa do vírus da leucemia murina de Moloney, do vírus da leucemia murina de Rauscher e do vírus da imunodeficiência humana (Ono et al., 1990).

Alguns estudos mostraram que hidrocarbonetos aromáticos policíclicos, como o benzo(a)pireno, são um dos possíveis causadores de câncer na pele e nos pulmões em animais experimentais (Boutwell, 1977; Buening et al., 1978; Deutsch-Wengel et al., 1983). Mukhtar e colaboradores verificaram que a miricetina diminuiu o risco de tumorigenicidade cutânea induzida por hidrocarbonetos aromáticos policíclicos (Mukhtar et al., 1988).

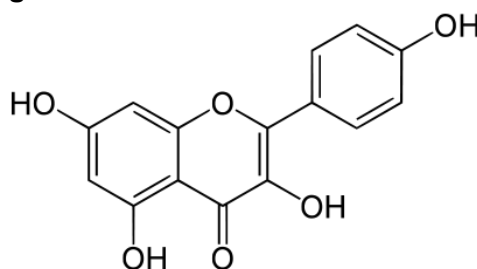
No trabalho de Grenier e colaboradores (2015), o efeito da miricetina foi estudado quanto as propriedades de crescimento e virulência de *Porphyromonas gingivalis* (*P. gingivalis*), bem como na resposta inflamatória induzida por *P. gingivalis* em células hospedeiras. A atividade quelante de ferro da miricetina pode ser atribuída à atividade antibacteriana deste flavonol. Ela atenuou a virulência de *P. gingivalis* ao reduzir a expressão de genes que codificam importantes fatores de virulência, incluindo proteinases (rgpA, rgpB e kgp) e adesinas (fimA, hagA e hagB). A miricetina também impediu, de forma dependente da dose, a ativação do NF-κB em um modelo de monócito. Além disso, inibiu a secreção de IL-6, IL-8 e MMP-3 por fibroblastos gengivais estimulados por *P. gingivalis*. Cai e Wu (1996) mostraram que a miricetina apresentou efeito inibitório contra patógenos periodontais Gram-negativos como *P. gingivalis* e *Prevotella intermedia* em baixa concentração (20µg/mL),

mas baixa atividade contra *S. mutans* e *Actinomyces viscosus* com valores de CIM de 2500 e 1250 µg/mL, respectivamente. Na concentração de 0,5 mg/mL, outro estudo mostrou que a miricetina apresentou significantes zonas de inibição, variando entre 13.4 e 19.2mm contra *Bacillus subtilis*, *Corynebacterium diphtheria*, *Corynebacterium pseudodiphtheriticum*, *Micrococcus lysodieticus*, *S. aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Staphylococcus saprophyticus*, *Enterococcus faecalis*, *Enterococcus faecium*, *Streptococcus pneumonia*, *Streptococcus pyogenes*, *E. coli*, *Klebsiella pneumonia*, *Proteus mirabilis*, *P. aeruginosa*, *Salmonella enterica* sorovar *Typhi*, *Salmonella paratyphi*, *Shigella dysenteriae*, *Shigella sonnei* e *Shigella flexneriae*, mas a potência foi maior para bactérias Gram positivas (Thiyagarajah et al., 1991).

2.3 CANFEROL

O canferol (3,5,7-tri-hidroxi-2-(4-hidroxifenil)-4H-1-benzopiran-4-ona), outro membro da classe dos flavonóis, encontra-se principalmente na composição de maçãs, brócolis, morangos, feijões e chá (Somerset e Johannot, 2008), e em plantas usadas na medicina tradicional (Calderón-Montaño et al., 2011). Ele pode ser estar ligado a açúcares como glicose, ramnose, galactose e rutinose formando glicosídeos (Calderón-Montaño et al., 2011).

Figura 3. Fórmula molecular do canferol



Fonte: site da Sigma-Aldrich

Canferol têm mostrado excelente atividade antioxidante e pode reagir com H_2O_2 , HOCl, superóxido, óxido nítrico, entre outros, em ensaios em cultura de células (Velloso et al., 2011). Este flavonol atua, quando em baixas concentrações, diretamente no peroxinitrito (espécies reativas de nitrogênio) e

em radicais hidroxila, enquanto que em altas concentrações, aumenta a expressão de enzimas antioxidantes (Calderón-Montaña et al., 2011).

Numerosos estudos mostraram que o estresse oxidativo extenso pode levar à inflamação crônica, que, por sua vez, resulta em doenças como o câncer e nos distúrbios cardiovasculares e neurológicos (Reuter et al., 2010). Diversos trabalhos relatam que o canferol, os glicosídeos de canferol e/ou as plantas contendo canferol apresentaram atividade antiinflamatória não apenas in vitro, mas também in vivo (Park et al., 2009; Kim et al., 2010; De Melo et al., 2009; Della et al., 1988).

Como efeito anticancerígeno, foi estudada a ação do canferol na redução do risco de desenvolvimento de alguns tipos de câncer, incluindo câncer de ovário (Gates et al., 2007), câncer gástrico (Garcia-Closas et al., 1999), câncer de pâncreas (Nothlings et al., 2007) e câncer de pulmão (Cui et al., 2008; Garcia-Closas et al., 1998).

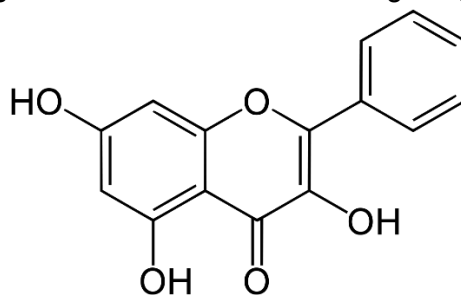
Em relação à atividade antibacteriana, existem vários estudos mostrando o efeito inibitório do canferol sobre algumas espécies. Kataoka e colaboradores inocularam *Helicobacter pylori* em gerbilos, e após quatro semanas foi administrado canferol, via oral, duas vezes por dia durante 10 dias. Observou-se então que o flavonol diminuiu significativamente o número de colônias da bactéria no estômago dos roedores (Kataoka et al., 2001). Em outro estudo, Habbu et al (2009) observaram que a administração oral de canferol-7-O-metil-3-sulfato (2 mg/Kg, diariamente por 7 dias) aumentou significativamente a sobrevivência de camundongos infectados com a bactéria *Klebsiella pneumoniae*. Sugeriu-se que o canferol possa ser usado em combinação com antibióticos em casos de resistência, pois ele e seus glicosídeos podem atuar sinergicamente com esses fármacos contra bactérias (Lim et al., 2007; Otsuka et al., 2008; Xu et al., 2001).

No estudo de Wu e colaboradores (2013), a atividade inibitória de três flavonas polimetoxiladas (PMFs), três flavonas e quatro flavonóis contra *Escherichia coli* foram determinadas usando o método de microdiluição. Dentre os compostos, o canferol exibiu a maior atividade antibacteriana (CIM = 25 µg/mL), enquanto a nobiletina apresentou a menor atividade (CIM = 177 µg/mL).

2.4 GALANGINA

Outro flavonol é a galangina (GAL) (3,5,7-trihidroxiflavona), presente em alta concentração na própolis, substância resinosa produzida por abelhas por meio da mistura de suas secreções com produtos obtidos de diversas plantas (Heo et al., 2001).

Figura 4. Fórmula molecular da galangina



Fonte: site da Sigma-Aldrich

Diversos estudos mostram que a galangina possui atividade farmacológica como a ação antioxidante e anti-mutagênica (Cushnie e Lamb, 2006; Gwak et al., 2011; Heo et al., 2001). E além desses efeitos, a galangina apresenta ação anti-obesidade, anti-inflamatória, antimicrobiana e antiviral in vitro e in vivo (Wang et al, 2002; Miyajima et al, 2004; Cushnie et al, 2007; Meyer et al, 1997; Sinha et al, 2014). Foi relatado também que este composto inibe a inflamação de causa alérgica derivada de mastócitos (Kim et al, 2013).

Em um estudo realizado por Afolayan e colaboradores (1997), verificou que a galangina teve atividade inibitória contra *Aspergillus tamarii*, *Aspergillus flavus*, *Cladosporium sphaerospermum*, *Penicillium digitatum* and *Penicillium italicum*. Já na revisão de Cushnie e colaboradores (2003), a galangina mostrou ter uma concentração inibitória mínima de 25 a 50 µg/mL contra seis cepas de *S. aureus*, mas atividade desprezível contra as outras espécies (*Enterococcus faecalis*, *Enterococcus faecium*, *Escherichia coli* e *Pseudomonas aeruginosa*), revelando baixo nível de espectro de atividade antibacteriana.

3 OBJETIVO

O objetivo do presente estudo foi avaliar a atividade antimicrobiana e antibiofilme dos flavonóis: quercetina, miricetina, canferol e galangina sobre *Streptococcus mutans*, *Enterococcus faecalis*, *Actinomyces israelii*, *Lactobacillus casei*, *Fusobacterium nucleatum* e *Candida albicans*, visando buscar agentes terapêuticos para aplicação endodôntica.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Flavonoides e Controles

Os flavonóis **Quercetina (Q4951, Sigma)**, **Miricetina (#70050, Sigma)**, **Canferol (#60010Sigma)** e **Galangina (#282200, Sigma)** foram comprados da empresa Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, EUA). Soluções estoques dos flavonoides foram preparadas e congeladas em DMSO (Sigma Aldrich). Como controle positivo foi avaliado o digluconato de clorexidina (Farmácia Manipullis, Araçatuba – SP/BR).

4.2 Cepas microbianas e condições de crescimento

Para a avaliação da atividade antimicrobiana foram utilizadas as seguintes cepas bacterianas padrão: *Streptococcus mutans* (ATCC 25175), *Enterococcus faecalis* (ATCC 51299), *Actinomyces israelii* (ATCC 12102), *Lactobacillus casei* (ATCC 393), *Fusobacterium nucleatum* (NCTC 11326) e uma levedura – *Candida albicans* (ATCC 26790). Os meios de culturas usados para cada espécie bacteriana foram os seguintes: Mitis Salivarius Agar da Difco Laboratories (Detroit, MI, EUA) para *S. mutans*, Brain Heart Infusion Agar – BHIA (Difco) para *A. israelii* e *E. faecalis*, Rogosa Agar (Difco) para *L. casei* e Sabouraud Dextrose Agar – SDA (Difco) contendo cloranfenicol (40mg/ml) para *C. albicans*. Para *F. nucleatum*, BHIA foi suplementado com 5 mg/mL de hemina, 10mg/mL de menadiona, extrato de levedura (YE, Difco) e 5% de sangue desfibrinado de carneiro. Todas as cepas são certificadas e foram doadas pela Fundação Oswaldo Cruz – FIOCRUZ, Rio de Janeiro. A pureza das cepas foi confirmada pelo método de Gram. As cepas microbianas foram reativadas em seus respectivos meios de cultura, incubadas a 37°C durante 24h em aerobiose (*C. albicans*), ou atmosfera de 5% de CO₂ (Incubadora, HF212-UV) (*S. mutans*, *E. faecalis*, *A. israelii* e *L. casei*) ou em jarras de anaerobiose a 37°C contendo geradores de anaerobiose (AnaeroGen™ 2,5L Atmosphere Generation Systems) (*F. nucleatum*), para posterior obtenção das suspensões bacterianas.

4.3 Análise da atividade antimicrobiana em cultura planctônica

4.3.1 Ensaios de CIM (concentração inibitória mínima) e CBM/CFM (concentração bactericida/fungicida mínima)

Para essa análise foram realizados ensaios para determinar a concentração inibitória mínima (CIM) e a concentração bactericida/fungicida mínima (CBM/CFM). As CIMs e CBM/CFMs foram determinadas pelo método de microdiluição em caldo, baseados nas normas do CLSI (Clinical and Laboratory Standards Institute). Resumidamente, quando a cultura atingiu a fase logarítmica, as células foram separadas por centrifugação a 2.686xg por 10 minutos a 4° C. Estas foram lavadas em solução salina e suspendidas em caldo Mueller-Hinton - MH (Difco) para bactérias, BHI com hemina e menadiona para *F. nucleatum* e RPMI (Sigma) para *C. albicans*. Em seguida, o número de células foi ajustado utilizando-se MH ou RPMI 2x concentrado para obtenção de 10⁵ células/mL para bactérias e 10³ células/mL para fungos. Um inóculo de 50µL foi então incubado em 50µL da diluição seriada do antimicrobiano em água destilada estéril (0,003 – 2mg/mL). Após incubação por 24h a 37°C, as placas de microtitulação foram analisadas a 550nm em um leitor de Microplacas (BioTek Instruments, USA). Foram realizados três ensaios independentes. Suspensões bacterianas foram incubadas em água destilada estéril, DMSO e digluconato de clorexidina, como controles. A CIM foi definida como a menor concentração do antimicrobiano teste ou da clorexidina que não houve crescimento detectável pela leitura. Uma solução de resazurina (R7017 – Sigma Aldrich) a 0,5µg/mL foi utilizada para auxiliar na determinação da CIM. Os meios contendo essa concentração do CIM e duas concentrações maiores foram diluídos seriadamente e plaqueadas em meio Mueller-Hinton Agar (MHA) ou SDA e incubados a 37° C por 48h para determinação da CBM/CFM. As UFC (Unidades formadoras de colônia) foram contadas com auxílio de estereomicroscópio binocular (Labomed, USA).

4.4 Análise da atividade antimicrobiana em biofilme

4.4.1 Efeito dos flavonoides sobre o biofilme formado em microplacas

Os ensaios de biofilme foram conduzidos apenas com os flavonoides que inibiram 100% do crescimento microbiano na cultura planctônica (CBM<2mg/mL). Os ensaios foram realizados de acordo com Massunari et al. (2017). Microplacas de 96 poços com fundo em U receberam um pré-

tratamento com 200µL/poço de saliva artificial (composição: 800mL de água deionizada, 1,6g de extrato de levedura, 4g de peptona, 0,28g de NaCl, 1,6g de glicose ou 3,2g de sacarose, 0,16g de CaCl₂, 0,16g de KCl e 0,8g de mucina) durante um período de 4 horas a 37°C na estufa de 5% CO₂ (coating phase). Após o período de incubação, a saliva foi removida e cada poço recebeu 20µl da suspensão microbiana (10⁵UFC/mL) e 180µL de caldo BHI suplementado com 1% de glicose para as bactérias e SDA também suplementado para *Candida albicans*. As placas foram incubadas à 37°C na estufa de CO₂. Após 48 horas, o meio de cultura foi removido e os poços lavados com solução salina estéril (0.9% NaCl) para a remoção das células não aderidas. Posteriormente, 200µL de cada flavonoide (2,5x a 10x CBM/CFM, limitando a 5 mg/mL) foi colocado em cada poço e as placas incubadas por 24h. Todos os poços foram então plaqueados em BHIA ou SDA e as placas incubadas novamente durante 24-48 horas. Após esse período foi realizada a leitura das placas por meio da contagem das UFC. Digluconato de Clorexidina ou Anfotericina (5/10x CFM) foram utilizados como controle positivo e o biofilme em meio DMSO (sem antimicrobiano teste) como controle negativo. Os ensaios foram realizados em triplicata para cada microrganismo em três experimentos independentes.

4.5 Análise estatística

Os resultados das contagens de UFC/mL foram transformados em log₁₀ (UFC+1) e a percentagem de viabilidade microbiana foi determinada considerando a média da contagem para o controle (H₂O) como 100%. Os dados foram considerados paramétricos por meio do teste de Kolmogorov-Smirnov e submetidos aos testes de ANOVA, seguido pelo teste de Tukey.

5 RESULTADOS

5.1 Análise da atividade antimicrobiana em cultura planctônica

5.1.1 Ensaios de CIM (concentração inibitória mínima) e CBM/CFM (concentração bactericida/fungicida mínima)

As CIMs e CBM/CFM encontradas para os flavonoides variaram de 0,03mg/mL a 2mg/mL e são apresentadas na tabela 1. Os flavonoides canferol e quercetina não apresentaram atividade antimicrobiana para nenhuma cepa avaliada (CIM>2mg/mL). Galangina apresentou atividade inibitória e bactericida para *A. israelii* e reduziu o crescimento de *Candida albicans*. Já a miricetina foi capaz de inibir ou eliminar quase todos os microrganismos para qual foi testada, exceto *C. albicans*. O mais sensível dos microrganismos foi *Actinomyces israelii* que teve seu crescimento afetado tanto pela galangina quanto pela miricetina. Somente os grupos em que foi possível determinar a CBM, ou seja, 100% de eliminação do microrganismo no teste de cultura planctônica, foram selecionados para o ensaio de biofilme, sendo então galangina para *C. albicans* e *A. israelii* e miricetina para *S. mutans*, *A. israelii* e *L. casei* e *F. nucleatum*.

Tabela 1. Valores de CIM e CBM/CFM (em mg/mL) para os compostos contra os microrganismos avaliados

Flavonol	Microrganismo	CIM (mg/mL)	CBM/CFM (mg/mL)
Galangina	<i>S. mutans</i>	>2	>2
	<i>E. faecalis</i>	>2	>2
	<i>A. israelii</i>	0,031	0,031
	<i>L. casei</i>	>2	>2
	<i>F. nucleatum</i>	>2	>2
	<i>C. albicans</i>	2	2
Miricetina	<i>S. mutans</i>	0,5	0,5
	<i>E. faecalis</i>	2	2
	<i>A. israelii</i>	0,25	0,5
	<i>L. casei</i>	1	2
	<i>F. nucleatum</i>	0,125	0,25
	<i>C. albicans</i>	>2	>2
Cloroxidina	<i>S. mutans</i>	0,0002	0,002
	<i>E. faecalis</i>	0,004	0,004
	<i>A. israelii</i>	0,002	0,002
	<i>L. casei</i>	0,002	0,004
	<i>F. nucleatum</i>	0,004	0,004
Anfotericina B	<i>C. albicans</i>	0,009	0,009

Fonte: elaborado pelo autor

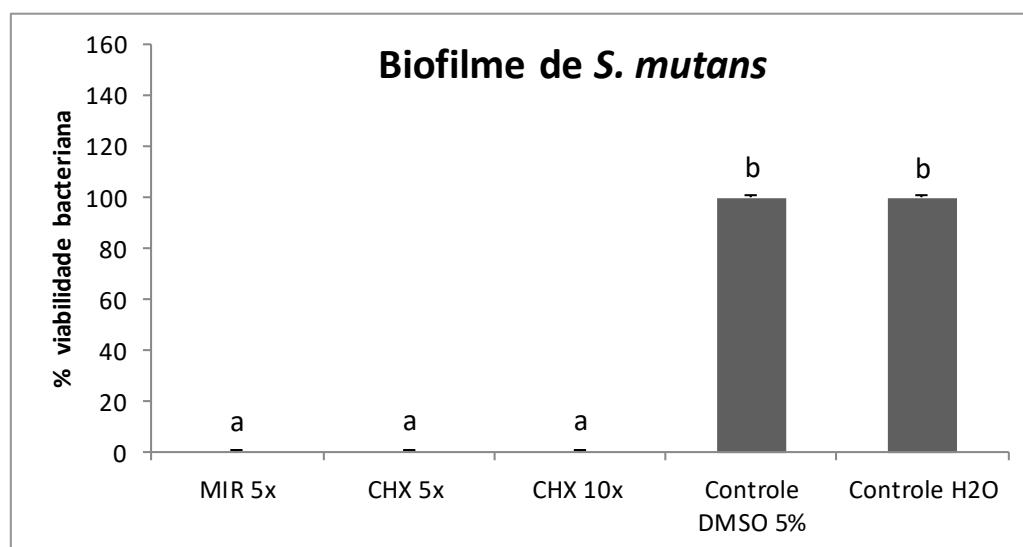
5.2 Análise da atividade antimicrobiana em biofilme

5.2.1 Efeito dos flavonoides sobre o biofilme formado em microplacas

As figuras 5, 6, 7, 8, 9 e 10 apresentam a porcentagem de redução bacteriana dos biofilmes tratados com os flavonoides que apresentaram CBM/CFM para os microrganismos *S. mutans*, *E. faecalis*, *A. israelii*, *L. casei*, *F. nucleatum* e *C. albicans*. O flavonoide miricetina foi capaz de eliminar totalmente o biofilme de *S. mutans* e *E. faecalis*, nas concentrações testadas. Miricetina e galangina promoveram a redução significativa do biofilme de *A. israelii*, entretanto nenhum desses foi capaz de eliminá-lo. A melhor ação contra biofilme de *L. casei* foi demonstrada pela miricetina, superior ao controle CHX 10xCBM. O biofilme de *F. nucleatum* também foi reduzido significativamente pela miricetina. Já em relação ao biofilme de *Candida albicans*, houve uma redução significativa do biofilme formado, porém nas concentrações testadas, a galangina não foi capaz de eliminá-lo completamente, assim como o controle positivo, Anfotericina B.

Figura 5. Efeito da miricetina e CHX sobre o biofilme de *S. mutans*.

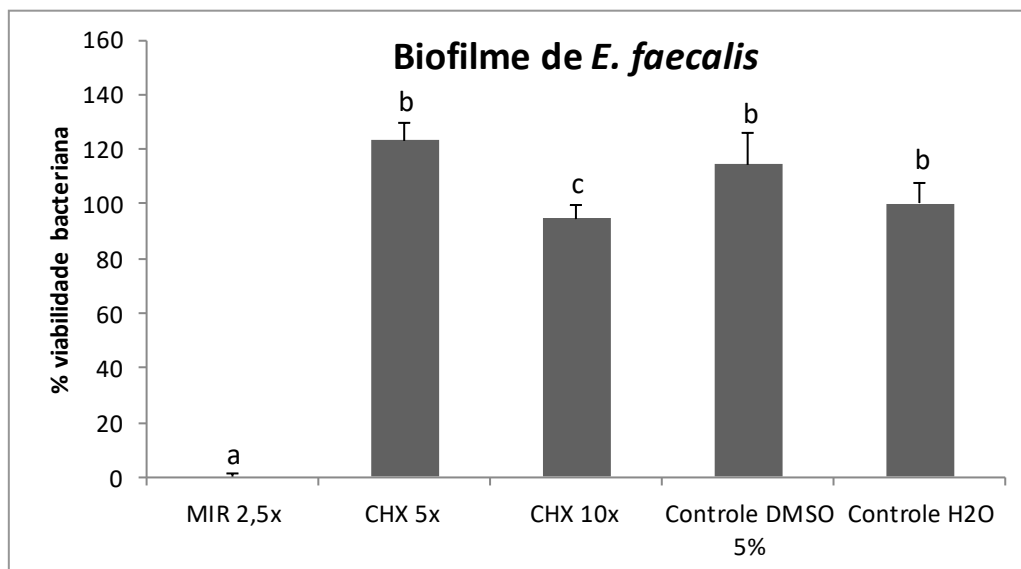
^a Letras diferentes mostram diferença estatística entre os grupos, segundo os testes de ANOVA/Tukey, considerando $p < 0,05$.



Fonte: elaborado pelo autor

Figura 6. Efeito da miricetina e CHX sobre o biofilme de *E. faecalis*.

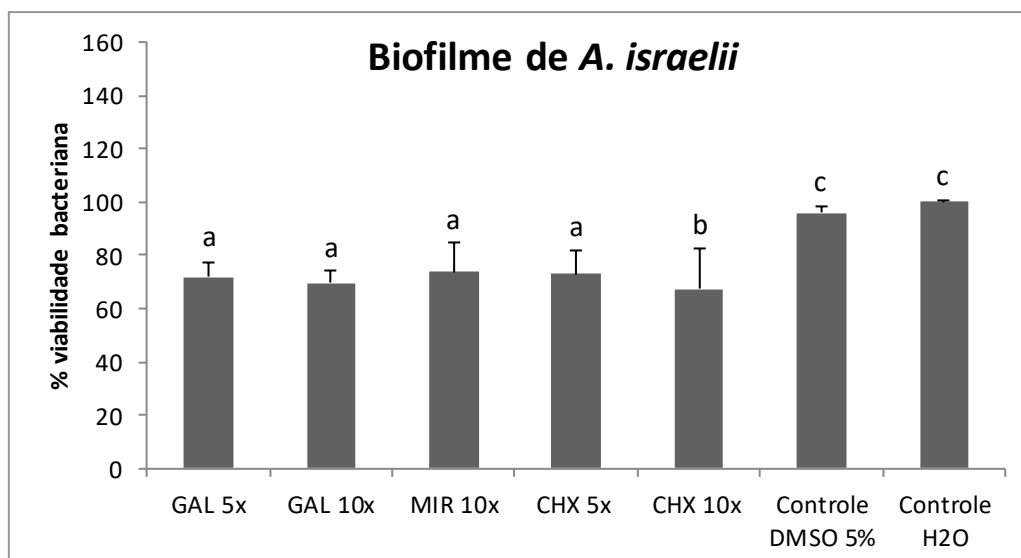
^a Letras diferentes mostram diferença estatística entre os grupos, segundo os testes de ANOVA/Tukey, considerando $p < 0,05$.



Fonte: elaborado pelo autor

Figura 7. Efeito da miricetina, galangina e CHX sobre o biofilme de *A. israelii*.

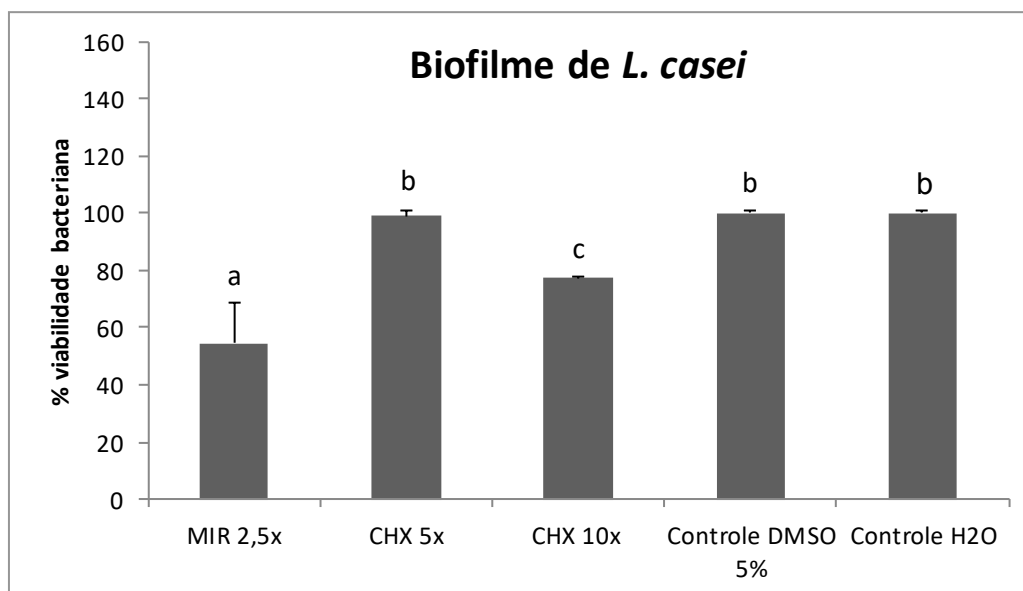
^a Letras diferentes mostram diferença estatística entre os grupos, segundo os testes de ANOVA/Tukey, considerando $p < 0,05$.



Fonte: elaborado pelo autor

Figura 8. Efeito da miricetina e CHX sobre o biofilme de *L. casei*.

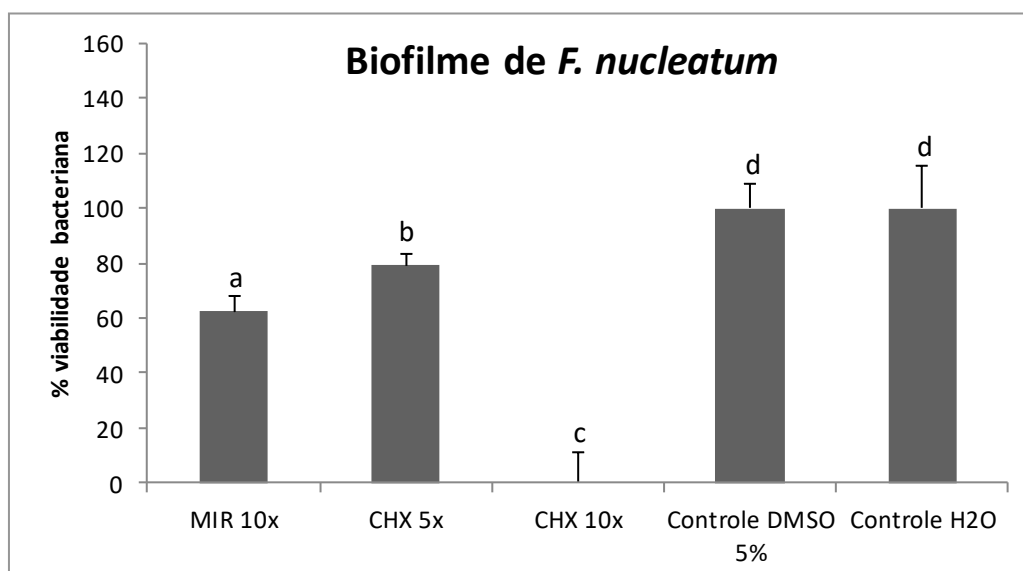
^a Letras diferentes mostram diferença estatística entre os grupos, segundo os testes de ANOVA/Tukey, considerando $p < 0,05$.



Fonte: elaborado pelo autor

Figura 9. Efeito da miricetina e controle CHX sobre o biofilme de *F. nucleatum*.

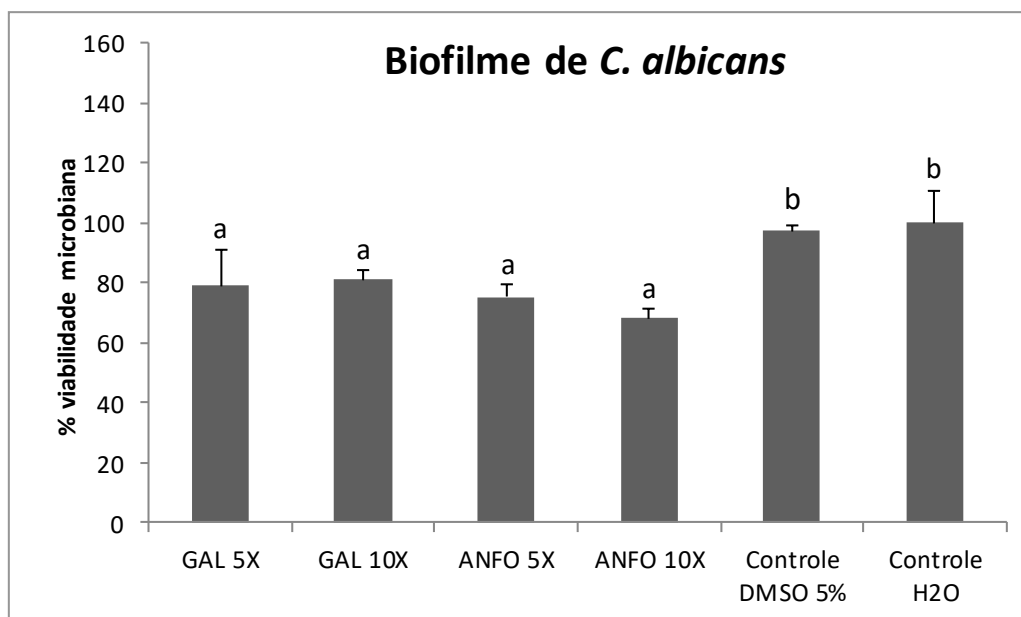
^a Letras diferentes mostram diferença estatística entre os grupos, segundo os testes de ANOVA/Tukey, considerando $p < 0,05$.



Fonte: elaborado pelo autor

Figura 10. Efeito da galangina e anfotericina sobre o biofilme de *C. albicans*.

^a Letras diferentes mostram diferença estatística entre os grupos, segundo os testes de ANOVA/Tukey, considerando $p < 0,05$.



Fonte: elaborado pelo autor

6 DISCUSSÃO

No presente trabalho, a quercetina e o canferol não apresentaram atividade antimicrobiana para nenhum dos microrganismos testados. De modo contrário, no estudo de Jaisinghani (2017), a quercetina teve concentração inibitória mínima para *S. aureus*, *P. aeruginosa* na concentração de 20 µg/mL enquanto *P. vulgaris* e *E. coli* foram inibidas nas concentrações de 300 µg/mL e 400 µg/mL, respectivamente. Porém, *Shigella flexneri* e *Lactobacillus casei var. shirota* foram completamente indiferentes à quercetina mesmo na concentração de 500 µg/mL, mostrando que a ação da quercetina pode variar entre microrganismos. Em estudo de Wu e colaboradores (2013) que avaliaram a atividade inibitória de três flavonas polimetoxiladas (PMFs), três flavonas e quatro flavonóis por meio do método de microdiluição, o canferol exibiu a maior atividade antibacteriana (CIM = 25 µg/mL) contra *Escherichia coli*. Pode-se especular que haja diferença na execução do método de microdiluição entre os estudos e variação na atividade antimicrobiana de acordo com a espécie ou até mesmo a cepa bacteriana ou fúngica estudada.

Neste presente estudo, a galangina inibiu apenas *A. israelii* e *C. albicans* e a miricetina destacou-se ao afetar todas as bactérias *S. mutans*, *E. faecalis*, *A. israelii*, *L. casei* e *F. nucleatum*, tanto na ação inibitória quanto na bactericida, porém não teve efeito sobre *C. albicans*. Em revisão de Cushnie e colaboradores (2003), foi notado reduzido espectro de ação da galangina, mostrando ter ação inibitória contra *S. aureus*, mas atividade desprezível contra as outras espécies como *Enterococcus faecalis*, *Enterococcus faecium*, *Escherichia coli* e *Pseudomonas aeruginosa*. Já a miricetina mostrou amplo espectro de ação inibindo patógenos periodontais Gram-negativos, como *P. gingivalis* e *P. intermedia* em baixa concentração (20µg/mL) (Cai e Wu, 1996) e outros patógenos Gram-positivos e Gram-negativos como *B. subtilis*, *Corynebacterium diphtheria*, *C. diphtheriticum*, *Micrococcus lysodieticus*, *S. aureus*, *S. epidermidis*, *S. saprophyticus*, *E. faecalis*, *E. faecium*, *Streptococcus pneumonia*, *S. pyogenes*, *E. coli*, *K. pneumonia*, *P. mirabilis*, *P. aeruginosa*, *S. typhi*, *S. paratyphi*, *S. dysenteriae*, *S. sonnei* and *S. flexneriae*, mas a potência foi maior para bactérias Gram positivas (Thiyagarajah et al., 1991). Quanto à ação sobre *C. albicans*, o estudo apontou o efeito antifúngico do

extrato de *Chrysobalanus icaco* contendo flavonoides como miricetina, rutina e quercetina, sobre isolados clínicos de *C. albicans* (CIM 3,12-6,25 mg/mL) e efeito sobre cepa padrão de *C. albicans* (ATCC) com CIM < 1,56 mg/mL (Silva et al., 2017).

A ação antibiofilme da miricetina foi capaz de eliminar *S. mutans* e *E. faecalis* e promover uma redução significativa do biofilme de *A. israelii*, *L. casei* e *F. nucleatum*. Quando comparada ao grupo controle, a miricetina reduziu significativamente o biofilme de *A. israelii*, de forma similar ao da clorexidina 5x e menor em relação a clorexidina 10x. Quanto a ação antibiofilme da galangina, também apresentou uma redução significativa para o biofilme de *A. israelii* e para o da *C. albicans* reduzindo similarmente ao controle anfotericina nas duas concentrações, 5x e 10x. A combinação de miricetina com farnesol e fluoreto mostrou efeito in vitro alterando a síntese de matriz de polissacarídeos extracelulares e a habilidade de tolerar estresses de *S. mutans* e também teve efeito in vivo reduzindo o desenvolvimento de lesões de cárie em ratos, sem alterar a população total e níveis de *S. mutans* dentro do biofilme (Falsetta et al., 2012). Em estudo recente, Rocha et al. (2018) verificou que essa combinação também reduziu significativamente polissacarídeos extracelulares na matriz do biofilme misto formado por *S. mutans* e *C. albicans*. Rodríguez-Pérez et al. (2016) também mostraram efeito da miricetina reduzindo significativamente biofilme de *E. coli* comparada ao controle sem antimicrobianos. Contudo, ainda há poucos estudos sobre o efeito antibiofilme da miricetina. Quanto à galangina, no estudo de Gabriela et al. (2014), avaliou-se o efeito da planta *Zuccagnia punctata* Cav. sobre o crescimento e fatores de virulência de espécies de *Candida*, demonstrando valores de CIM de 400 µg/mL e CFM entre 400 e 1200 µg/mL. Os principais compostos isolados dessa planta foram chalconas, galangina, crisina, naringenina e pinocembrina. Esses compostos, quando isolados, foram mais efetivos como inibidores da formação de biofilme de *Candida* e ao inibir exoenzimas desses fungos que o próprio extrato da planta.

De forma geral, estudos prévios sugeriram que a atividade antibacteriana dos flavonoides pode estar atribuída a três mecanismos de ação: 1) dano à membrana citoplasmática, sendo por perfuração (Ikigai et al, 1993) ou na redução na fluidez da membrana (Tsuchiya et al, 2000) ou

gerando peróxido de hidrogênio (Arakawa et al, 2004); 2) inibição da síntese de ácidos nucleicos (Mori et al, 1987), causada pela inibição da topoisomerase (Bernard et al., 1997; Plaper et al., 2003), e 3) a inibição do metabolismo energético, sendo pela inibição da NADH-citocromo c-redutase (Haraguchi et al, 1998) ou através da inibição da síntese de ATP (Chinnam et al, 2010). Novos dois mecanismos foram apontados, sendo a inibição da síntese da parede celular (causada pela inibição da d-alanina-d-alanina ligase (Wu et al, 2008) e a inibição da síntese da membrana celular, provocada ao inibir os genes FabG (Zhang et al, 2004; Li et al, 2006; Zhang et al, 2008), FabI (Zhang et al, 2004), FabZ (Zhang et al, 2008), Rv0636 (Brown et al, 2007) ou KAS III (Jeong et al, 2009).

Quanto ao mecanismo de ação especificamente da galangina e da miricetina, poucos estudos foram encontrados na literatura. Ouyang et al. (2018) notaram que galangina inibiu significativamente a expressão de genes de hidrolases de mureína (*atl*, *lytM*, and *lytN*) e seus genes regulatórios (*cidR*, *cidA*, and *cidB*) mostrando ter efeito na síntese da parede celular de *Staphylococcus aureus*. Para a miricetina, estudo apontou seu efeito inibitório sobre a helicase DnaB de *E. coli* com valor de IC₅₀ de 11.3 µM, sendo que essa enzima tem papel crucial na replicação e alongação do DNA (Griep et al., 2007). Assim, mais estudos são necessários para avaliar os efeitos antimicrobiano e antibiofilme de miricetina e galangina e seus possíveis mecanismos de ação.

7 CONCLUSÃO

Conclui-se que, entre os flavonóis testados, a miricetina teve o melhor efeito antimicrobiano e antibiofilme contra microrganismos associados com infecção endodôntica.

REFERÊNCIAS

- Chávez De Paz LE, Dahlén G, Molander A, Möller A, Bergenholtz G. Bacteria recovered from teeth with apical periodontitis after antimicrobial endodontic treatment. *Int Endod J*. 2003 Jul;36(7):500-8.
- Siqueira JF Jr, Rôças IN. Diversity of endodontic microbiota revisited. *J Dent Res*. 2009 Nov;88(11):969-81.
- Sakamoto M, Siqueira JF Jr, Rôças IN, Benno Y. Molecular analysis of the root canal microbiota associated with endodontic treatment failures. *Oral Microbiol Immunol*. 2008 Aug;23(4):275-81.
- Ring KC, Murray PE, Namerow KN, Kuttler S, Garcia-Godoy F. The comparison of the effect of endodontic irrigation on cell adherence to root canal dentin. *J Endod*. 2008 Dec;34(12):1474-9.
- Heys DR, Cox CF, Heys RJ, Avery JK. Histological considerations of direct pulp capping agents. *J Dent Res*. 1981 Jul;60(7):1371-9.
- Filho, H. N.; Nagem, H. D.; Coutinho, K. Q.; Carvalho, P. R. M. de A.; Fiuza, C. T. Propriedade do Paramonoclorofenol Canforado e Paramonoclorofenol Canforado Associado ao Hidróxido de Cálcio. *Pesq. Bras. Odontoped. Clin. Integr.*, João Pessoa, 7 (3): 235-239, set./dez. 2007.
- Lewis BB, Chestner SB. Formaldehyde in dentistry: a review of mutagenic and carcinogenic potential. *J Am Dent Assoc*. 1981 Sep;103(3):429-34.
- Cohen, S; burns. *Caminhos da Polpa*. 7. ed.; Guanabara Koogan, 2000.
- Panche AN, Diwan AD, Chandra SR. Flavonoids: an overview. *J Nutr Sci*. 2016 Dec 29;5: e47.
- Pietta PG. Flavonoids as antioxidants. *J Nat Prod*. 2000 Jul;63(7):1035-42.
- Tripoli E, Guardia MA, Giammanco S, Majo DD, Giammanco M 2007. Citrus flavonoids: Molecular structure, biological activity and nutritional properties: A review. *Food Chem* 104: 466-479.
- Sharan K, Siddiqui JA, Swarnkar G, Maurya R, Chattopadhyay N. Role of phytochemicals in the prevention of menopausal bone loss: evidence from in vitro and in vivo, human interventional and pharma-cokinetic studies. *Curr Med Chem*. 2009;16(9):1138-57.
- Pilšáková L, Riečanský I, Jagla F. The physiological actions of isoflavone phytoestrogens. *Physiol Res*. 2010;59(5):651-64.
- Domitrovic R (2011) The molecular basis for the pharmacological activity of anthocyanins. *Curr Med Chem*, 18: 4454-69.

Cushnie TP, Lamb AJ. Antimicrobial activity of flavonoids. *Int J Antimicrob Agents*. 2005 Nov;26(5):343-56.

Mittal AK, Kumar S, Banerjee UC. Quercetin and gallic acid mediated synthesis of bimetallic (silver and selenium) nanoparticles and their antitumor and antimicrobial potential. *J Colloid Interface Sci*. 2014 Oct 1;431:194-9.

Deschner EE, Ruperto J, Wong G, Newmark HL. Quercetin and rutin as inhibitors of azoxymethanol-induced colonic neoplasia. *Carcinogenesis*. 1991 Jul;12(7):1193-6.

Nijveldt RJ, van Nood E, van Hoorn DE, Boelens PG, van Norren K, van Leeuwen PA. Flavonoids: a review of probable mechanisms of action and potential applications. *Am J Clin Nutr*. 2001 Oct;74(4):418-25.

Russo M, Spagnuolo C, Tedesco I, Bilotto S, Russo GL. The flavonoid quercetin in disease prevention and therapy: facts and fancies. *Biochem Pharmacol*. 2012 Jan 1;83(1):6-15.

Mitchell AE, Hong YJ, Koh E, Barrett DM, Bryant DE, Denison RF, Kaffka S. Ten-year comparison of the influence of organic and conventional crop management practices on the content of flavonoids in tomatoes. *J Agric Food Chem*. 2007 Jul 25;55(15):6154-9.

Crespy V, Morand C, Manach C, Besson C, Demigne C, Remesy C. Part of quercetin absorbed in the small intestine is conjugated and further secreted in the intestinal lumen. *Am J Physiol*. 1999 Jul;277(1 Pt 1):G120-6.

Olthof MR, Hollman PC, Vree TB, Katan MB. Bioavailabilities of quercetin-3-glucoside and quercetin-4'-glucoside do not differ in humans. *J Nutr*. 2000 May;130(5):1200-3.

Heijnen CG, Haenen GR, Oostveen RM, Stalpers EM, Bast A. Protection of flavonoids against lipid peroxidation: the structure activity relationship revisited. *Free Radic Res*. 2002 May;36(5):575-81.

de Souza RF, De Giovani WF. Antioxidant properties of complexes of flavonoids with metal ions. *Redox Rep*. 2004;9(2):97-104.

Boots AW, Li H, Schins RP, Duffin R, Heemskerk JW, Bast A, Haenen GR. The quercetin paradox. *Toxicol Appl Pharmacol*. 2007 Jul 1;222(1):89-96.

Shoskes DA, Zeitlin SI, Shahed A, Rajfer J. Quercetin in men with category III chronic prostatitis: a preliminary prospective, double-blind, placebo-controlled trial. *Urology*. 1999 Dec;54(6):960-3.

Tijburg LB, Mattern T, Folts JD, Weisgerber UM, Katan MB. Tea flavonoids and cardiovascular disease: a review. *Crit Rev Food Sci Nutr*. 1997 Dec;37(8):771-85.

Rao YK, Fang SH, Tzeng YM. Inhibitory effects of the flavonoids isolated from *Waltheria indica* on the production of NO, TNF-alpha and IL-12 in activated macrophages. *Biol Pharm Bull.* 2005 May;28(5):912-5.

de Pascual-Teresa S, Johnston KL, DuPont MS, O'Leary KA, Needs PW, Morgan LM, Clifford MN, Bao Y, Williamson G. Quercetin metabolites downregulate cyclooxygenase-2 transcription in human lymphocytes ex vivo but not in vivo. *J Nutr.* 2004 Mar;134(3):552-7.

During A, Larondelle Y. The O-methylation of chrysin markedly improves its intestinal anti-inflammatory properties: Structure-activity relationships of flavones. *Biochem Pharmacol.* 2013 Dec 15;86(12):1739-46.

Jaisinghani RN. Antibacterial properties of quercetin. *Microbiology research.* 2017 v. 8, n. 1.

Mirzoeva OK, Grishanin RN, Calder PC. Antimicrobial action of propolis and some of its components: the effects on growth, membrane potential and motility of bacteria. *Microbiol Res.* 1997 Sep;152(3):239-46.

Rauha JP, Remes S, Heinonen M, Hopia A, Kähkönen M, Kujala T, Pihlaja K, Vuorela H, Vuorela P. Antimicrobial effects of Finnish plant extracts containing flavonoids and other phenolic compounds. *Int J Food Microbiol.* 2000 May 25;56(1):3-12.

Wollenweber E. Flavones and flavonols. *The Flavonoids: Advances in Research.* 1982 pp. 189-259.

Canada AT, Giannella E, Nguyen TD, Mason RP. The production of reactive oxygen species by dietary flavonols. *Free Radic Biol Med.* 1990;9(5):441-9.

Koeppen BH, Herrmann K. Flavonoid glycosides and hydroxycinnamic acid esters of blackcurrants (*Ribes nigrum*). Phenolics of fruits 9. *Z Lebensm Unters Forsch.* 1977 Aug 31;164(4):263-8.

Hertog MG, Hollman PC, Katan MB, Kromhout D. Intake of potentially anticarcinogenic flavonoids and their determinants in adults in The Netherlands. *Nutr Cancer.* 1993;20(1):21-9.

Kühnau J. The flavonoids. A class of semi-essential food components: their role in human nutrition. *World Rev Nutr Diet.* 1976;24:117-91.

Ong KC, Khoo HE. Biological effects of myricetin. *Gen Pharmacol.* 1997 Aug;29(2):121-6.

Ko SY. Myricetin suppresses LPS-induced MMP expression in human gingival fibroblasts and inhibits osteoclastogenesis by downregulating NFATc1 in RANKL-induced RAW 264.7 cells. *Arch Oral Biol.* 2012 Dec;57(12):1623-32.

Fu RH, Liu SP, Chu CL, Lin YH, Ho YC, Chiu SC, Lin WY, Shyu WC, Lin SZ. Myricetin attenuates lipopolysaccharide-stimulated activation of mouse bone marrow-derived dendritic cells through suppression of IKK/NF- κ B and MAPK signalling pathways. *J Sci Food Agric*. 2013 Jan 15;93(1):76-84.

Park HH, Lee S, Son HY, Park SB, Kim MS, Choi EJ, Singh TS, Ha JH, Lee MG, Kim JE, Hyun MC, Kwon TK, Kim YH, Kim SH. Flavonoids inhibit histamine release and expression of proinflammatory cytokines in mast cells. *Arch Pharm Res*. 2008 Oct;31(10):1303-11.

Ferreira LC, Grabe-Guimarães A, de Paula CA, Michel MC, Guimarães RG, Rezende SA, de Souza Filho JD, Saúde-Guimarães DA. Anti-inflammatory and antinociceptive activities of *Campomanesia adamantium*. *J Ethnopharmacol*. 2013 Jan 9;145(1):100-8.

Ong KC, Khoo HE. Effects of myricetin on glycemia and glycogen metabolism in diabetic rats. *Life Sci*. 2000 Aug 25;67(14):1695-705.

Kumamoto T, Fujii M, Hou DX. Myricetin directly targets JAK1 to inhibit cell transformation. *Cancer Lett*. 2009 Mar 8;275(1):17-26.

Maggioni D, Nicolini G, Rigolio R, Biffi L, Pignataro L, Gaini R, Garavello W. Myricetin and naringenin inhibit human squamous cell carcinoma proliferation and migration in vitro. *Nutr Cancer*. 2014;66(7):1257-67.

Hagenacker T, Hillebrand I, Wissmann A, Büsselberg D, Schäfers M. Anti-allodynic effect of the flavonoid myricetin in a rat model of neuropathic pain: Involvement of p38 and protein kinase C mediated modulation of Ca²⁺ channels. *Eur J Pain*. 2010 Nov;14(10):992-8.

Robak J, Duniec Z, Rzadkowska-Bodalska H, Olechnowicz-Stepień W, Cisowski W. The effect of some flavonoids on non-enzymatic lipid oxidation and enzymatic oxidation of arachidonic acid. *Pol J Pharmacol Pharm*. 1986 Sep-Dec;38(5-6):483-91.

Robak J, Gryglewski RJ. Flavonoids are scavengers of superoxide anions. *Biochem Pharmacol*. 1988 Mar 1;37(5):837-41.

Robak J, Shridi F, Wolbís M, Królikowska M. Screening of the influence of flavonoids on lipoxygenase and cyclooxygenase activity, as well as on nonenzymic lipid oxidation. *Pol J Pharmacol Pharm*. 1988 Sep-Oct;40(5):451-8.
Ono K, Nakane H. Mechanisms of inhibition of various cellular DNA and RNA polymerases by several flavonoids. *J Biochem*. 1990 Oct;108(4):609-13.

Ono K, Nakane H, Fukushima M, Chermann JC, Barré-Sinoussi F. Differential inhibitory effects of various flavonoids on the activities of reverse transcriptase and cellular DNA and RNA polymerases. *Eur J Biochem*. 1990 Jul 5;190(3):469-76. Erratum in: *Eur J Biochem* 1991 Aug 1;199(3):769.

Boutwell RK. The function and mechanism of promoters of carcinogenesis. *CRC Crit Rev Toxicol.* 1974 Jan;2(4):419–443.

Buening MK, Wislocki PG, Levin W, Yagi H, Thakker DR, Akagi H, Koreeda M, Jerina DM, Conney AH. Tumorigenicity of the optical enantiomers of the diastereomeric benzo[a]pyrene 7,8-diol-9,10-epoxides in newborn mice: exceptional activity of (+)-7 β ,8 α -dihydroxy-9 α ,10 α -epoxy-7,8,9,10-tetrahydrobenzo[a]pyrene. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1978 Nov;75(11):5358-61.

Deutsch-Wenzel RP, Brune H, Grimmer G, Dettbarn G, Misfeld J. Experimental studies in rat lungs on the carcinogenicity and dose-response relationships of eight frequently occurring environmental polycyclic aromatic hydrocarbons. *J Natl Cancer Inst.* 1983 Sep;71(3):539-44.

Mukhtar H, Das M, Khan WA, Wang ZY, Bik DP, Bickers DR. Exceptional activity of tannic acid among naturally occurring plant phenols in protecting against 7,12-dimethylbenz(a)anthracene-, benzo(a)pyrene-, 3-methylcholanthrene-, and N-methyl-N-nitrosourea-induced skin tumorigenesis in mice. *Cancer Res.* 1988 May 1;48(9):2361-5.

Grenier D, Chen H, Ben Lagha A, Fournier-Larente J, Morin MP. Dual Action of Myricetin on *Porphyromonas gingivalis* and the Inflammatory Response of Host Cells: A Promising Therapeutic Molecule for Periodontal Diseases. *PLoS One.* 2015 Jun 29;10(6):e0131758.

Cai L, Wu CD. Compounds from *Syzygium aromaticum* possessing growth inhibitory activity against oral pathogens. *J Nat Prod.* 1996 Oct;59(10):987-90.

Thiyagarajah P, Kuttan SC, Lim SC, Teo TS, Das NP. Effect of myricetin and other flavonoids on the liver plasma membrane Ca²⁺ pump. Kinetics and structure-function relationships. *Biochem Pharmacol.* 1991 Mar 1;41(5):669-75.

Somerset SM, Johannot L. Dietary flavonoid sources in Australian adults. *Nutr Cancer.* 2008;60(4):442-9.

Velloso JCR, Regasini LO, Khalil NM, Bolzani VS, Khalil OAK, Manente FA, Pasquini Netto H, Oliveira OMMF. Antioxidant and cytotoxic studies for kaempferol, quercetin and isoquercitrin. *Eclética Química*, 2011;36(2):07-20.

Calderón-Montaña JM, Burgos-Morón E, Pérez-Guerrero C, López-Lázaro M. A review on the dietary flavonoid kaempferol. *Mini Rev Med Chem.* 2011 Apr;11(4):298-344.

Reuter S, Gupta SC, Chaturvedi MM, Aggarwal BB. Oxidative stress, inflammation, and cancer: how are they linked? *Free Radic Biol Med.* 2010 Dec 1;49(11):1603-16.

Park MJ, Lee EK, Heo HS, Kim MS, Sung B, Kim MK, Lee J, Kim ND, Anton S, Choi JS, Yu BP, Chung HY. The anti-inflammatory effect of kaempferol in aged

kidney tissues: the involvement of nuclear factor-kappaB via nuclear factor-inducing kinase/IkappaB kinase and mitogen-activated protein kinase pathways. *J Med Food*. 2009 Apr;12(2):351-8.

Kim JM, Lee EK, Kim DH, Yu BP, Chung HY. Kaempferol modulates pro-inflammatory NF-kappaB activation by suppressing advanced glycation endproducts-induced NADPH oxidase. *Age (Dordr)*. 2010 Jun;32(2):197-208.

De Melo GO, Malvar Ddo C, Vanderlinde FA, Rocha FF, Pires PA, Costa EA, de Matos LG, Kaiser CR, Costa SS. Antinociceptive and anti-inflammatory kaempferol glycosides from *Sedum dendroideum*. *J Ethnopharmacol*. 2009 Jul 15;124(2):228-32.

Della Loggia R, Ragazzi E, Tubaro A, Fassina G, Vertua R. Anti-inflammatory activity of benzopyrones that are inhibitors of cyclo- and lipo-oxygenase. *Pharmacol Res Commun*. 1988 Dec;20 Suppl 5:91-4.

Gates MA, Tworoger SS, Hecht JL, De Vivo I, Rosner B, Hankinson SE. A prospective study of dietary flavonoid intake and incidence of epithelial ovarian cancer. *Int J Cancer*. 2007 Nov 15;121(10):2225-32.

Garcia-Closas R, Gonzalez CA, Agudo A, Riboli E. Intake of specific carotenoids and flavonoids and the risk of gastric cancer in Spain. *Cancer Causes Control*. 1999 Feb;10(1):71-5.

Nöthlings U, Murphy SP, Wilkens LR, Henderson BE, Kolonel LN. Flavonols and pancreatic cancer risk: the multiethnic cohort study. *Am J Epidemiol*. 2007 Oct 15;166(8):924-31.

Cui Y, Morgenstern H, Greenland S, Tashkin DP, Mao JT, Cai L, Cozen W, Mack TM, Lu QY, Zhang ZF. Dietary flavonoid intake and lung cancer--a population-based case-control study. *Cancer*. 2008 May 15;112(10):2241-8.

Garcia-Closas R, Agudo A, Gonzalez CA, Riboli E. Intake of specific carotenoids and flavonoids and the risk of lung cancer in women in Barcelona, Spain. *Nutr Cancer*. 1998;32(3):154-8.

Kataoka M, Hirata K, Kunikata T, Ushio S, Iwaki K, Ohashi K, Ikeda M, Kurimoto M. Antibacterial action of tryptanthrin and kaempferol, isolated from the indigo plant (*Polygonum tinctorium* Lour.), against *Helicobacter pylori*-infected Mongolian gerbils. *J Gastroenterol*. 2001 Jan;36(1):5-9.

Habbu PV, Mahadevan KM, Shastry RA, Manjunatha H. Antimicrobial activity of flavanoid sulphates and other fractions of *Argyreia speciosa* (Burm.f) Boj. *Indian J Exp Biol*. 2009 Feb;47(2):121-8.

Lim YH, Kim IH, Seo JJ. In vitro activity of kaempferol isolated from the *Impatiens balsamina* alone and in combination with erythromycin or clindamycin against *Propionibacterium acnes*. *J Microbiol*. 2007 Oct;45(5):473-7.

Otsuka N, Liu MH, Shiota S, Ogawa W, Kuroda T, Hatano T, Tsuchiya T. Anti-methicillin resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) compounds isolated from *Laurus nobilis*. *Biol Pharm Bull*. 2008 Sep;31(9):1794-7.

Xu HX, Lee SF. Activity of plant flavonoids against antibiotic-resistant bacteria. *Phytother Res*. 2001 Feb;15(1):39-43.

Wu T, Zang X, He M, Pan S, Xu X. Structure-activity relationship of flavonoids on their anti-*Escherichia coli* activity and inhibition of DNA gyrase. *J Agric Food Chem*. 2013 Aug 28;61(34):8185-90.

Heo MY, Sohn SJ, Au WW. Anti-genotoxicity of galangin as a cancer chemopreventive agent candidate. *Mutat Res*. 2001 May;488(2):135-50.

Cushnie TP, Lamb AJ. Assessment of the antibacterial activity of galangin against 4-quinolone resistant strains of *Staphylococcus aureus*. *Phytomedicine*. 2006 Feb;13(3):187-91.

Gwak J, Oh J, Cho M, Bae SK, Song IS, Liu KH, Jeong Y, Kim DE, Chung YH, Oh S. Galangin suppresses the proliferation of β -catenin response transcription-positive cancer cells by promoting adenomatous polyposis coli/Axin/glycogen synthase kinase-3 β -independent β -catenin degradation. *Mol Pharmacol*. 2011 Jun;79(6):1014-22.

Wang J, Mazza G. Inhibitory effects of anthocyanins and other phenolic compounds on nitric oxide production in LPS/IFN- γ -activated RAW 264.7 macrophages. *J Agric Food Chem*. 2002 Feb 13;50(4):850-7.

Miyajima Y, Kikuzaki H, Hisamoto M, Nikatani N. Antioxidative polyphenols from berries of *Pimenta dioica*. *Biofactors*. 2004;21(1-4):301-3.

Cushnie TP, Hamilton VE, Chapman DG, Taylor PW, Lamb AJ. Aggregation of *Staphylococcus aureus* following treatment with the antibacterial flavonol galangin. *J Appl Microbiol*. 2007 Nov;103(5):1562-7.

Meyer JJ, Afolayan AJ, Taylor MB, Erasmus D. Antiviral activity of galangin isolated from the aerial parts of *Helichrysum aureonitens*. *J Ethnopharmacol*. 1997 Apr;56(2):165-9.

Sinha R, Srivastava S, Joshi A, Joshi UJ, Govil G. In-vitro anti-proliferative and anti-oxidant activity of galangin, fisetin and quercetin: role of localization and intermolecular interaction in model membrane. *Eur J Med Chem*. 2014 May 22;79:102-9.

Kim, H.H., Bae, Y., Kim, S.H., 2013. Galangin attenuates mast cell-mediated allergic inflammation. *Food Chem. Toxicol.* 57, 209–216.

Afolayan AJ, Meyer JJ. The antimicrobial activity of 3,5,7-trihydroxyflavone isolated from the shoots of *Helichrysum aureonitens*. *J Ethnopharmacol* 1997;57:177–81.

Cushnie TP, Hamilton VE, Lamb AJ. Assessment of the antibacterial activity of selected flavonoids and consideration of discrepancies between previous reports. *Microbiol Res.* 2003;158(4):281-9.

Massunari L, Novais RZ, Oliveira MT, Valentim D, Dezan Junior E, Duque C. Antimicrobial Activity and Biocompatibility of the *Psidium cattleianum* Extracts for Endodontic Purposes. *Braz Dent J.* 2017 May-Jun;28(3):372-379.

Silva JP, Peres AR, Paixão TP, Silva AS, Baetas AC, Barbosa WL, Monteiro MC, Andrade MA. Antifungal Activity of Hydroalcoholic Extract of *Chrysobalanus icaco* Against Oral Clinical Isolates of *Candida* Species. *Pharmacognosy Res.* 2017 Jan-Mar;9(1):96-100.

Falsetta ML, Klein MI, Lemos JA, Silva BB, Agidi S, Scott-Anne KK, Koo H. Novel antibiofilm chemotherapy targets exopolysaccharide synthesis and stress tolerance in *Streptococcus mutans* to modulate virulence expression in vivo. *Antimicrob Agents Chemother.* 2012 Dec;56(12):6201-11.

Rocha GR, Florez Salamanca EJ, de Barros AL, Lobo CIV, Klein MI. Effect of tt-farnesol and myricetin on in vitro biofilm formed by *Streptococcus mutans* and *Candida albicans*. *BMC Complement Altern Med.* 2018 Feb 14;18(1):61.

Rodríguez-Pérez C, Quirantes-Piné R, Uberos J, Jiménez-Sánchez C, Peña A, Segura-Carretero A. Antibacterial activity of isolated phenolic compounds from cranberry (*Vaccinium macrocarpon*) against *Escherichia coli*. *Food Funct.* 2016 Mar;7(3):1564-73.

Gabriela N, Rosa AM, Catiana ZI, Soledad C, Mabel OR, Esteban SJ, Veronica B, Daniel W, Ines IM. The effect of *Zuccagnia punctata*, an Argentine medicinal plant, on virulence factors from *Candida* species. *Nat Prod Commun.* 2014 Jul;9(7):933-6.

Ikigai H, Nakae T, Hara Y, Shimamura T. Bactericidal catechins damage the lipid bilayer. *Biochim Biophys Acta.* 1993 Apr 8;1147(1):132-6.

Tsuchiya H, Iinuma M. Reduction of membrane fluidity by antibacterial sophoraflavanone G isolated from *Sophora exigua*. *Phytomedicine.* 2000 Apr;7(2):161-5.

Arakawa H, Maeda M, Okubo S, Shimamura T. Role of hydrogen peroxide in bactericidal action of catechin. *Biol Pharm Bull.* 2004 Mar;27(3):277-81.

Mori A, Nishino C, Enoki N, Tawata S. Antibacterial activity and mode of action of plant flavonoids against *Proteus vulgaris* and *Staphylococcus aureus*. *Phytochemistry* 1987;26:2231-4.

Bernard FX, Sablé S, Cameron B, Provost J, Desnottes JF, Crouzet J, Blanche F. Glycosylated flavones as selective inhibitors of topoisomerase IV. *Antimicrob Agents Chemother.* 1997 May;41(5):992-8.

Plaper A, Golob M, Hafner I, Oblak M, Solmajer T, Jerala R. Characterization of quercetin binding site on DNA gyrase. *Biochem Biophys Res Commun*. 2003 Jun 27;306(2):530-6.

Haraguchi H, Tanimoto K, Tamura Y, Mizutani K, Kinoshita T. Mode of antibacterial action of retrochalcones from *Glycyrrhiza inflata*. *Phytochemistry*. 1998 May;48(1):125-9.

Chinnam N, Dadi PK, Sabri SA, Ahmad M, Kabir MA, Ahmad Z. Dietary bioflavonoids inhibit *Escherichia coli* ATP synthase in a differential manner. *Int J Biol Macromol*. 2010 Jun;46(5):478-86.

Wu D, Kong Y, Han C, Chen J, Hu L, Jiang H, et al. d-alanine:d-alanine ligase as a new target for the flavonoids quercetin and apigenin. *Int J Antimicrob Agents* 2008;32:421–6.

Zhang YM, Rock CO. Evaluation of epigallocatechin gallate and related plant polyphenols as inhibitors of the FabG and FabI reductases of bacterial type II fatty-acid synthase. *J Biol Chem*. 2004 Jul 23;279(30):30994-1001.

Li BH, Zhang R, Du YT, Sun YH, Tian WX. Inactivation mechanism of the β -ketoacyl-[acyl carrier protein] reductase of bacterial type-II fatty acid synthase by epigallocatechin gallate. *Biochem Cell Biol* 2006;84:755–62.

Zhang F, Luo SY, Ye YB, Zhao WH, Sun XG, Wang ZQ, et al. The antibacterial efficacy of an aceraceous plant [Shantung maple (*Acer truncatum* Bunge)] may be related to inhibition of bacterial β -oxoacyl-acyl carrier protein reductase (FabG). *Biotechnol Appl Biochem* 2008;51:73–8.

Zhang L, Kong Y, Wu D, Zhang H, Wu J, Chen J, Ding J, Hu L, Jiang H, Shen X. Three flavonoids targeting the β -hydroxyacyl-acyl carrier protein dehydratase from *Helicobacter pylori*: crystal structure characterization with enzymatic inhibition assay. *Protein Sci*. 2008 Nov;17(11):1971-8.

Brown AK, Papaemmanouil A, Bhowruth V, Bhatt A, Dover LG, Besra GS. Flavonoid inhibitors as novel antimycobacterial agents targeting Rv0636, a putative dehydratase enzyme involved in *Mycobacterium tuberculosis* fatty acid synthase II. *Microbiology*. 2007 Oct;153(Pt 10):3314-22.

Jeong KW, Lee JY, Kang DI, Lee JU, Shin SY, Kim Y. Screening of flavonoids as candidate antibiotics against *Enterococcus faecalis*. *J Nat Prod*. 2009 Apr;72(4):719-24.

Ouyang J, Sun F, Feng W, Xie Y, Ren L, Chen Y. Antimicrobial Activity of Galangin and Its Effects on Murein Hydrolases of Vancomycin-Intermediate *Staphylococcus aureus* (VISA) Strain Mu50. *Chemotherapy*. 2018;63(1):20-28.

Griep MA, Blood S, Larson MA, Koepsell SA, Hinrichs SH. Myricetin inhibits *Escherichia coli* DnaB helicase but not primase. *Bioorg Med Chem*. 2007 Nov 15;15(22):7203-8