



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

KAREN CRISTIANE HIGA

**ATIVIDADE ANTI-INFLAMATÓRIA E CITOTOXICIDADE
DOS EXTRATOS GLICÓLICOS DE *Cynara cardunculus*
var. *scolymus* (L.) Fiori (ALCACHOFRA), *Myracrodruon*
urundeuva Allemão (AROEIRA-DO-SERTÃO) E
Camellia sinensis (L.) Kuntze (CHÁ VERDE)**

2016

KAREN CRISTIANE HIGA

**ATIVIDADE ANTI-INFLAMATÓRIA E CITOTOXICIDADE DOS
EXTRATOS GLICÓLICOS DE *Cynara cardunculus* var. *scolymus*
(L.) Fiori (ALCACHOFRA), *Myracrodruon urundeuva* Allemão
(AROEIRA-DO-SERTÃO) E *Camellia sinensis* (L.) Kuntze (CHÁ
VERDE)**

Tese apresentada ao curso de Odontologia do Instituto de Ciência e Tecnologia, UNESP – Univ Estadual Paulista, Campus de São José dos Campos, como parte dos requisitos para obtenção do título de DOUTOR, pelo Programa de Pós-Graduação em BIOPATOLOGIA BUCAL, Área de Microbiologia / Imunologia.

Orientadora: Profa. Adj. Luciane Dias de Oliveira

São José dos Campos

2016

Apresentação gráfica e normatização de acordo com:
Alvarez S, Coelho DCAG, Couto RAO, Durante APM. Guia prático para
Normalização de Trabalhos Acadêmicos do ICT. Rev. São José dos
Campos: ICT/UNESP; 2016.

Higa, Karen Cristiane

Atividade anti-inflamatória e citotoxicidade dos extratos
glicólicos de *Cynara cardunculus* var. *scolymus* (L.) Fiori
(alcachofra), *Myracrodruon urundeuva* Allemão (aroeira-do-sertão) e
de *Camellia sinensis* (L.) Kuntze (chá verde) / Karen Cristiane
Higa. - São José dos Campos : [s.n.], 2016.
66 f. : il.

Tese (Doutorado em Biopatologia Bucal) - Pós-graduação em
Biopatologia Bucal - Instituto de Ciência e Tecnologia de São José
dos Campos, UNESP - Univ Estadual Paulista, 2016.
Orientador: Luciane Dias de Oliveira.

1. Ação anti-inflamatória de extratos glicólicos. 2.
Citotoxicidade. 3. Alcachofra. 4. Aroeira-do-sertão. 5. Chá verde .
I. Oliveira, Luciane Dias de , orient. II. Instituto de Ciência e
Tecnologia de São José dos Campos, UNESP - Univ Estadual Paulista.
III. Universidade Estadual Paulista 'Júlio de Mesquita Filho'. IV.
UNESP - Univ Estadual Paulista. V. Título.

Ficha catalográfica elaborada pela Biblioteca Prof. Achille Bassi e Seção Técnica de Informática,
ICMC/USP com adaptações - STATi e STI do ICT/UNESP. Dados fornecidos pelo autor.

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 fevereiro de 2016

E-mail: higa_ka@hotmail.com

Assinatura: _____

BANCA EXAMINADORA

Profa. Adj. Luciane Dias de Oliveira (Orientadora)

Instituto de Ciências e Tecnologia
UNESP – Univ Estadual Paulista
Campus de São José dos Campos

Profa Dra. Luana Marotta Reis de Vasconcelos

Instituto de Ciências e Tecnologia
UNESP – Univ Estadual Paulista
Campus de São José dos Campos

Profa. Dra. Fernanda Malagutti Tome

UNIP - Universidade Paulista
Campus de São José dos Campos

Profa. Dra. Naira Correia Cusma Pelógia

UNITAU - Universidade de Taubaté
Campus de Taubaté

Profa. Dra. Simey Thury Vieira Fisch

UNITAU - Universidade de Taubaté
Campus de Taubaté

São José dos Campos, 23 de fevereiro de 2016.

DEDICATÓRIA

A Deus que me abençoou com essa oportunidade e me deu forças para concluir a pesquisa e colocou pessoas maravilhosas ao meu lado durante este período.

A Ana Cecília e todas amigas do Centro Cultural Alfa que me apoiaram e rezaram por mim.

Aos meus pais, Satiko Tsunoda Higa e Mário Higa, pelo carinho, paciência e dedicação. Não há palavras suficientes para agradecer-lhes por tudo de bom que ambos fizeram e fazem por mim.

Aos meus familiares e meus irmãos Juliane e Eduardo que sempre torceram por mim.

AGRADECIMENTOS

À UNESP - Univ Estadual Paulista, na pessoa do diretor da Faculdade de Odontologia de São José dos Campos, Prof. Dr. Carlos Augusto Pavanelli e do vice-diretor Prof. Dr. Estevão Tomomitsu Kimpara,

Ao Programa de Pós-graduação em Biopatologia Bucal, na pessoa da coordenadora Profa. Adj. Juliana Campos Junqueira,

À minha orientadora Profa. Adj. Luciane Dias de Oliveira, pelo convívio amigável, atenção, dedicação, carinho, paciência em me ajudar a superar as dificuldades no decorrer da pesquisa,

Aos docentes do Programa de Pós-graduação em Biopatologia Bucal, prof. Tit. Antonio Olavo Cardoso Jorge, Profa. Adj. Cristiane Yumi Koga-Ito, profa. Dra. Graziella Nuernberg B. B. Brito, prof. Dr. Mauro P. Samaria, profa. Dra. Ana Lia Anbinder, profa. Dra. Samira Esteves Afonso Camargo, prof. Dr. Sigmar de Mello Rode pelo convívio fraterno e atenção na minha formação acadêmica,

À professoras Dra. Luana M. R. de Vasconcellos, a profa. Dra. Fernanda Malagutti Tome, a profa. Dra. Naira Correia Cusma Pelógia, e a profa. Dra. Simey Thury Vieira Fisch por aceitarem o convite e se disporem a participar da minha banca.

AGRADECIMENTOS

À minha amiga, Dra. Adeline, que me incentivou a fazer o doutorado, e que sempre esteve disposta a ajudar quando preciso,

Ao Dr. Jonatas Rafael, à Daiane e ao Felipe que permitiram que os acompanhassem em seus experimentos, o que me ajudou muito na prática e no dia a dia da pesquisa,

Aos amigos, Dra. Miriam, Rafaella, Marisol, Marcelo, Ana Carolina, Nádia, Isabela, Felipe, Ana Luíza, Lucas, Leile, Lívia, Fernanda, Rodney e Ligia companheiros de créditos e de trabalho,

Aos professores. MSc. Simone Lapena, MSc.Leda Robusti, Dra. Leila, Dra. Mara, prof Dr. Cleber e demais docentes da Unip que sempre me ajudaram,

À Olga Z. Higa, Fernando Baratela, Teresa Marsi, Anderson Lobo e todos que contribuíram no trabalho de biomateriais.,

À Renata e toda equipe da biblioteca Professora Leila Novaes que sempre me ajudaram na pesquisa e à Mariana amiga que sempre me apoiou.

“Persevera no cumprimento exato das obrigações de agora. - Esse trabalho - humilde, monótono, pequeno - é oração plasmada em obras que te preparam para receber a graça do outro trabalho - grande, vasto e profundo - com que sonhas.”

São Josemaria Escrivá

SUMÁRIO

RESUMO	08
ABSTRACT	09
1 INTRODUÇÃO	10
2 REVISÃO DE LITERATURA	14
2.1 Macrófagos e citocinas	14
2.2 Plantas e fitoterápicos	15
2.2 Chá verde (<i>Camellia sinensis</i> (L.) Kuntze)	17
2.3 Aroeira-do-sertão (<i>Myracrodruon urundeuva</i> Allemão)	21
2.4 Alcachofra (<i>Cynara cardunculus</i> var. <i>scolymus</i> (L.)Fiori ...	23
3 PROPOSIÇÃO	27
4 MATERIAL E MÉTODOS	28
4.1 Avaliação da citotoxicidade dos extratos	28
4.1.1 Ensaio de citotoxicidade com MTT	30
4.2 Avaliação da atividade anti-inflamatória dos extratos	32
4.2.1 Ensaio Imunoenzimático ELISA.....	34
4.3 Análise estatística	37
5 RESULTADOS	38
6 DISCUSSÃO	52
7 CONCLUSÃO	60
8 REFERÊNCIAS	61

Higa KC. Atividade anti-inflamatória e citotoxicidade dos extratos glicólicos de *Cynara cardunculus* var. *scolymus* (L.) Fiori (alcachofra), *Myracrodruon urundeuva* Allemão (aroeira-do-sertão) e de *Camellia sinensis* (L.) Kuntze (chá verde) [tese]. São José dos Campos (SP): Instituto de Ciência e Tecnologia, UNESP – Univ Estadual Paulista; 2016.

RESUMO

A baixa citotoxicidade e ação anti-inflamatória são características interessantes para enxaguatórios bucais, dentifrícios e medicamentos de uso odontológico. Sendo assim, é necessário avaliar estas propriedades nos extratos glicólicos vegetais que podem ser ingredientes das formulações desses produtos. O presente estudo avaliou as seguintes atividades biológicas para cada um dos extratos glicólicos de *Cynara cardunculus* var. *scolymus* (L.) Fiori (alcachofra), *Myracrodruon urundeuva* Allemão (aroeira-do-sertão) e *Camellia sinensis* (L.) Kuntze (chá verde) em culturas de macrófagos de camundongo (RAW 264.7) pelo tempo de exposição de 5 min e 24 h: a) atividade citotóxica pelo método do MTT em 11 diluições seriadas, sendo que a concentração inicial dos extratos foi de 200mg/mL. b) atividade anti-inflamatória, após estímulo com lipopolissacarídeo (LPS) de *Escherichia coli* pelo método ELISA quantificou IL-1 β , TNF- α e IL-10. Os resultados foram analisados estatisticamente por ANOVA e teste de Tukey, com $p \leq 5\%$. A citotoxicidade dos extratos foi dose e tempo dependentes. No tempo de exposição de 5 min, o extrato de alcachofra apresentou citotoxicidade na concentração de 200 mg/mL. No tempo de exposição de 24 h, o chá verde apresentou citotoxicidade nas concentrações ≥ 50 mg/mL, aroeira-do-sertão estimulou a proliferação de macrófagos na concentração de 0,39 mg/mL a 12,5 mg/mL e a alcachofra apresentou citotoxicidade nas concentrações $\geq 12,5$ mg/mL. O extrato de chá verde apresentou potencial anti-inflamatório na concentração de 12,5 mg/mL e foi dose dependente, promovendo diminuição da produção de citocinas pró-inflamatória, como IL-1 β e TNF- α . A aroeira-do-sertão apresentou ação imunopotenciadora na concentração de 12,5 mg/mL no tempo de exposição de 24 h. Com relação a alcachofra há necessidade de novos estudos para identificar sua ação imunomoduladora.

Palavras-chave: Ação anti-inflamatória de extratos glicólicos. Citotoxicidade. Alcachofra. Aroeira-do-sertão. Chá verde. RAW 264.7.

Higa KC. *Anti-inflammatory activity and cytotoxicity of glycolic extracts of Cynara cardunculus var. scolymus (L.) Fiori (artichoke), Myracrodruon urundeuva Allemão (pepper tree) and Camellia sinensis (L.) Kuntze (green tea) [doctorate thesis]. São José dos Campos (SP): Institute of Science and Technology, UNESP – Univ Estadual Paulista; 2016.*

ABSTRACT

The low cytotoxicity and anti-inflammatory action are interesting features for mouthwashes, toothpastes and dental medication. Therefore, it is necessary to evaluate these properties in plant glycolic extracts which can be ingredients of the formulation of these products. This study evaluated the following biological activities for each of the glycolic extracts of Cynara cardunculus var. scolymus (L.) Fiori (artichoke), Myracrodruon urundeuva Allemão (pepper tree) and Camellia sinensis (L.) Kuntze (green tea) in mouse macrophage cultures (RAW 264.7) by the exposure time of 5 min and 24 h. a) cytotoxicity by MTT method in 11 serial dilutions, the initial concentration of the extracts was 200 mg/mL. b) Anti-inflammatory activity after stimulation with lipopolysaccharide (LPS) of Escherichia coli was performed by immunoenzymatic test (ELISA) using specific antibodies to quantify IL-1 β , TNF- α and IL-10. The results were subordinated to statistical analyses (ANOVA and Turkey test), with $p \leq 0,05$. The cytotoxicity of the extracts was dependent on dose and time. At 5 min exposure time, artichoke extract showed cytotoxicity at a concentration of 200 mg/mL. At 24 h exposure time, green tea showed cytotoxicity at the concentrations ≥ 50 mg/mL, pepper tree stimulated the proliferation of macrophages in the concentrations of 0,39mg/mL to 12.5 mg/mL and artichoke showed cytotoxicity at the concentrations ≥ 12.5 mg/mL. Green tea extract showed anti-inflammatory potential at a concentration of 12.5 mg/mL and was dependent on dose, promoting a decrease production of pro-inflammatory cytokines as IL-1 β and TNF- α . Pepper tree presented immunopotentiating action at a concentration of 12.5 mg/mL at 24 h of exposure time. Regarding artichoke, there is a need for further studies to identify their immunomodulatory action.

Keywords: Anti-inflammatory activity of glycolic extract. Cytotoxicity. Artichoke. Pepper tree. Green tea. RAW 264.7.

1 INTRODUÇÃO

O conhecimento tradicional de plantas medicinais para fins terapêuticos é amplamente utilizado, mas, para que seu uso seja seguro, há necessidade de pesquisas para avaliar suas propriedades terapêuticas e suas possíveis ações tóxicas para o organismo vivo. Assim, o conhecimento tradicional de plantas medicinais se aliado à pesquisa científica podem potencializar a produção de novos medicamentos e dentifrícios.

O enxaguatório bucal e/ou dentifrício ideal apresenta propriedades como baixa citotoxicidade e ação anti-inflamatória. Sendo assim, é necessário avaliar estas propriedades nos extratos glicólicos vegetais que farão parte da formulação de produtos de uso odontológico.

De acordo com a literatura (Zapolska-Downar et al., 2002; Zhu et al., 2005; Figueredo et al., 2014), pode-se verificar que existem muitos estudos que utilizam extratos alcoólicos de diversas plantas. Em 2002, Reis et al. verificaram o efeito genotóxico do etanol em células da mucosa bucal pelo aumento de micronúcleos em células esfoliadas da língua no grupo de indivíduos expostos ao etanol em relação ao grupo controle. Assim, o álcool pode agredir as células da mucosa bucal, sendo, portanto, de interesse analisar extratos vegetais livres de álcool, como os extratos glicólicos que possuem propilenoglicol como veículo.

Existe no mercado alguns enxaguatórios bucais sem álcool como Colgate Plax® e Listerine Zero®, ambos contêm na formulação propilenoglicol. Este é muito usado como carreador para emulsificantes e veículo para flavorizantes preferencialmente ao etanol, pois impede a volatilização e fornece um aroma mais estável (Rowe et

al., 2003). O propilenoglicol é encontrado também em formulações de cosméticos. Esta substância é um fluido incolor, viscoso, apresenta baixa toxicidade sendo solúvel tanto em água como em álcool. Além disso, o propilenoglicol apresenta baixo potencial de sensibilização da pele (Lessmann et al., 2015). Assim, o propilenoglicol presente nos extratos glicólicos vegetais pode ser empregado em formulações de medicamentos e dentifrícios sem apresentar risco à saúde.

Há várias formulações de enxaguatórios bucais, estes produtos são importantes para prevenir o surgimento da cárie e da gengivite juntamente com a escovação, mas não há no mercado enxaguatórios contendo extratos glicólicos vegetais.

Os extratos glicólicos escolhidos para o presente estudo foram das seguintes espécies vegetais: *Camellia sinensis* (L.) Kuntze (chá verde), *Myracrodruon urundeuva* Allemão (aroeira-do-sertão) e *Cynara cardunculus* var. *scolymus* (L.) Fiori (alcachofra), sendo que esta última pertence à Relação Nacional de Plantas Medicinais de Interesse ao Sistema Único de Saúde (RENISUS) (Brasil, 2009).

Chá verde, obtida das folhas da *Camellia sinensis* (L.) Kuntze, é um dos chás mais consumidas no mundo. A obtenção do chá verde é a partir das folhas não oxidadas desta espécie. O chá verde é amplamente empregado em várias formulações de cosméticos, alimentos funcionais e fitoterápicos.

O chá preto é originado das folhas oxidadas da *Camellia sinensis*, muito consumido como alimento. Tanto o chá verde como o chá preto é originado das folhas da *Camellia sinensis*, mas apresentam constituintes químicos diferentes. O chá verde tem atividade anti-inflamatória maior que o chá preto e igual à indometacina em ratos com artrite reumatoide (Ramadan et al., 2015). Um estudo clínico randomizado em pacientes com periodontite sobre o efeito da pasta de dente com 1,4% do extrato de chá verde observou que este pode servir

como um coadjuvante terapêutico para tratamento da periodontite (Hrishi et al., 2015).

Vários estudos sobre o chá verde sugerem sua ação anti-inflamatória (Choi et al., 2014; Hrishi et al., 2014; Ramadan et al., 2015; Marinovic et al., 2015; Cyboran et al., 2015; Chen et al., 2015), antioxidante (Ramadan et al., 2015; Cyboran et al., 2015) e antimicrobiana (Zhao et al., 2013; Radji et al., 2013; Antunes et al., 2014). Tais ações foram estudadas tanto *in vitro* quanto *in vivo*, utilizando diversos derivados vegetais como extrato seco, extrato aquoso e extrato alcóolico, mas são escassos os estudos sobre a ação anti-inflamatória em extratos glicólicos do chá verde.

Myracrodruon urundeuva Allemão, muito conhecida como aroeira-do-sertão é uma espécie nativa do cerrado brasileiro. Em um estudo sobre plantas medicinais de Pernambuco observou que os extratos de aroeira-do-sertão apresentaram indicações terapêuticas abrangentes como: ação anti-inflamatória e expectorante, pode ainda ser usado para tratamento de gonorréia, úlceras bucais e doenças nas gengivas (Saraiva et al., 2015).

Cynara cardunculus var. *scolymus* (L.) Fiori. conhecida popularmente como alcachofra é uma espécie perene e herbácea, nativa da região mediterrânea. Desde tempos antigos é apreciado como um prato saboroso com propriedades benéficas para saúde. A alcachofra contém substâncias com ação antioxidante (Zapolska-Downar et al., 2002; Durazzo et al., 2013; Gurel et al., 2013; Fissore et al., 2014), anti-inflamatórias (Zapolska-Downar et al., 2002; Yasukawa et al., 2010; Gurel et al., 2013; Tanaka et al., 2013) e antimicrobiana (Zhu et al., 2004, 2005). Além disso, o Formulário de Fitoterápicos da Farmacopéia Brasileira assinala que a infusão de suas folhas secas deve ser usada via oral como antidispeptico, colerético e colagogo (Brasil, 2015).

Diante dos estudos promissores dos extratos vegetais obtidos dessas três espécies de plantas medicinais, ainda são poucas as

pesquisas sobre extratos glicólicos vegetais. Assim, há um grande interesse em avaliar a citotoxicidade e ação anti-inflamatória desses extratos para sua aplicação na área odontológica em diferentes formulações terapêuticas.

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 Macrófagos e citocinas

Os macrófagos são células originadas dos monócitos e estão presentes no tecido conjuntivo ou parênquima de órgãos, podendo viver por meses a anos. Estas células fazem parte do sistema imune e estão envolvidas tanto na inflamação aguda quanto na inflamação crônica.

A inflamação pode ser induzida por estímulos endógenos ou exógenos, como o lipopolissacarídeo (LPS), e promove que as células do sistema imune, macrófagos, produzam e liberem mediadores químicos como as citocinas para atuar na defesa do organismo ao estímulo (Mota et al., 2015).

Uma vez que os macrófagos são estimulados pelo LPS presente na parede externa das bactérias gram-negativas, eles liberam citocinas pró-inflamatórias com IL-1 β e TNF- α e citocinas reguladoras anti-inflamatórias com IL-10. Além disso, essas células são capazes de fagocitar os patógenos e atuar como células apresentadoras de antígenos para potencializar a ativação de linfócitos T.

TNF- α é produzida principalmente por macrófagos, mas esta citocina pode ser produzida por outras células também. É uma proteína de fase aguda, que inicia a produção de uma cascata de citocinas, pode aumentar a permeabilidade vascular e o recrutamento de novos macrófagos e neutrófilos para o local de uma infecção (Jorjão, 2012). Assim, os macrófagos são células importantes na resposta imune que desencadeia um processo inflamatório (Tong et al., 2015)

IL-1 β participa da resposta do hospedeiro a uma invasão de um micróbio, lesão tecidual e em doenças autoimune, esta citocina pode ser produzida por vários tipos de células e principalmente por macrófagos (Nootash et al., 2013).

IL-10 é uma citocina regulatória e multifuncional que apresenta ação imunossupressora. A principal função da IL-10 parece ser na regulação da resposta inflamatória, reduzindo a destruição do hospedeiro induzida por uma resposta inflamatória excessiva. Além disso, a IL-10 bloqueia receptores de quimiocinas, inibe o efeito de citocinas pró-inflamatórias e inibe ativação de macrófagos (Nootash et al., 2013).

Assim um determinado estímulo aos macrófagos pode apresentar efeitos imunomoduladores, ou seja, modificar ou regular uma ou mais funções do sistema imune e promover a secreção de citocinas pró e anti-inflamatórias (Estève et al., 2016).

2.2 Plantas e fitoterápicos

A utilização da natureza para fins terapêuticos é tão antiga quanto a civilização humana. O Brasil é o país com a maior biodiversidade genética vegetal do mundo. A biodiversidade é a variedade que há entre os organismos vivos e as complexidades ecológicas nas quais elas ocorrem. Nas florestas tropicais, que correspondem a 7% da superfície da terra, há concentração de mais da metade das espécies vegetais. Diante de tamanha variedade de flora, há poucas pesquisas que aplicam plantas medicinais à produção de fármacos. No Brasil, a importação de medicamentos gira em torno de 84% dos fármacos, sendo que mais da metade da produção brasileira é feita por empresas multinacionais. Assim, há necessidade de buscar alternativas para superar a dependência externa (Guerra, Nodari, 2000).

No Brasil, o uso de plantas para tratamento de diversas doenças é muito comum, mas, para que seu uso seja seguro há necessidade de pesquisas para avaliar as propriedades terapêuticas e suas possíveis ações tóxicas para o organismo vivo.

Segundo a resolução da diretoria colegiada nº. 26 de 13 de maio de 2014, o fitoterápico provém de uma planta medicinal, ou seja, de uma espécie vegetal utilizada com propósitos terapêuticos. Sendo assim, o fitoterápico é o produto obtido de matéria-prima ativa vegetal, com exceção das substâncias isoladas, apresenta finalidade profilática, curativa ou paliativa. Este pode ser obtido do extrato vegetal, produto da extração, ou da droga vegetal que é a planta medicinal, ou suas partes, que contenham as substâncias químicas com ação terapêutica, submetida a processos de coleta/colheita, estabilização e secagem, podendo estar na forma íntegra, rasurada, triturada ou pulverizada. O “chá medicinal” é a droga vegetal com fins medicinais que pode ser preparada por meio de infusão, decocção ou maceração em água pelo consumidor, enquanto que os chás são enquadrados como alimento (Brasil, 2014). Portanto, a partir da planta até obter o medicamento fitoterápico são necessários testes que confirmem a segurança de sua ação *in vitro* e *in vivo*

Os extratos glicólicos de plantas, obtidos a partir da droga vegetal, contêm propilenoglicol e são muito empregados em cosméticos e medicamento fitoterápicos de uso tópico, assim há um grande interesse em analisar sua ação citotóxica e anti-inflamatória.

Em 2013, Oliveira JR et al. realizaram testes de citotoxicidade em macrófagos por tempo de exposição de 24 h dos extratos glicólicos das seguintes espécies vegetais *Equisetum arvense* L., *Glycyrrhiza glabra* L., *Punica granatum* L. e *Stryphnodendron barbatimam* Mart., cada um dos extratos na concentração de 50 mg/mL, apresentaram os respectivos valores de viabilidade celular: 48%, 52%,

76% e 86%. A viabilidade celular foi menor que 50% apenas no grupo tratado com *Equisetum arvense* L.

As ações antimicrobiana e citotóxica do extrato glicólico de bardana, *Arctium lappa* L. foram verificadas por Oliveira JR et al. (2014). Neste estudo, o extrato na concentração de 250 mg/mL foi microbicida para todas as espécies de microrganismos, como *Staphylococcus aureus*, *S. epidermidis*, *Streptococcus mutans*, *Candida albicans*, *C. tropicalis* e *C. glabrata* em meio planctônico, microbiostática para biofilmes e não citotóxica para macrófagos.

A ação antifúngica e citotóxica do extrato glicólico de abacateiro, *Persea americana* Miller foi estudada por Jesus et al. (2015). Nas concentrações de 50 mg/mL, 100 mg/mL e 200 mg/mL do extrato, houve uma redução significativa do biofilme de *C. albicans*; apenas a concentração de 50 mg/mL apresentou viabilidade celular maior que 50% em macrófagos.

Assim, não há estudos sobre o potencial imunomodulador dos extratos glicólicos de alcachofra, aroeira-do-sertão e chá verde em macrófagos *in vitro* e tais pesquisas potencializarão a produção de novos medicamentos e cosméticos de uso odontológico como dentifrícios e enxaguatórios bucais.

2.3 Chá verde [*Camellia sinensis* (L.) Kuntze]

Um possível candidato a apresentar ação anti-inflamatória e baixa citotoxicidade é o chá verde, mundialmente cada vez mais consumido. O chá verde pode ser comercializado de vários modos: como alimento na forma de chá, infusão das folhas secas; como medicamento produzido em farmácias de manipulação com receita

médica, em cápsulas na forma de extrato seco e como cosmético em formulações de géis e cremes na forma de extrato glicólico.

O chá verde é feito a partir das folhas da *Camellia sinensis* (L.) Kuntze, muito consumido devido a presença dos polifenóis antioxidantes como as catequinas: EGCG (3- galato de epigalocatequina), EGC (galato de epicatequina), ECG (epigalo catequina) e EC (epicatequina). Tais catequinas apresentam efeitos farmacológicos no chá verde (Chen et al., 2015; Marinovic et al., 2015; Ramadan et al., 2015).

De acordo com a ANVISA, chá é um alimento, não devendo ter alegações terapêuticas, sendo o produto constituído de uma ou mais partes de espécie(s) vegetal(is) inteira(s), fragmentada(s) ou moída(s), com ou sem fermentação, tostada(s) ou não. As folhas e talos da espécie vegetal *Camellia sinensis* estão previstas para o preparo de chá preto e chá verde, pois esta espécie está presente na tabela de espécies vegetais para o preparo de chás, conforme a Resolução RDC nº 267 de 2005 (Brasil, 2005)

O chá preto e o chá verde são provenientes das folhas da *Camellia sinensis* (L.) Kuntze. Esta espécie pertence a família Theaceae e habita climas úmidos. Durante a produção do chá preto, a enzima oxidase atua acelerando o processo de oxidação das catequinas (taninos do chá) em teaflavinas. Entretanto, se este processo de oxidação for inativado por tratamento com vapores nas folhas frescas da *Camellia sinensis* haverá produção de chá verde, com maior concentração de catequinas, que apresenta ações farmacológicas de grande interesse como ação anti-inflamatória (Ramadan et al., 2015).

Assim, muitos estudos mostram que o chá verde apresenta ação anti-inflamatória (Choi et al., 2014; Ramadan et al., 2015; Hrishi et al., 2014; Marinovic et al., 2015; Cyboran et al., 2015; Chen et al., 2015), antioxidante (Ramadan et al., 2015; Cyboran et al., 2015) e

antimicrobiana (Zhao et al., 2013; Radji et al., 2013; Antunes et al., 2014).

Zhao et al. (2013) realizaram um estudo sobre os benefícios potenciais na doença periodontal dos vários extratos de *Camellia sinensis* e verificaram que o chá verde, o chá branco, o chá oolong e o chá preto inibiram o crescimento e a aderência de *Porphyromonas gingivalis* em células epiteliais bucais.

A ação antimicrobiana do extrato aquoso de chá verde contra *S. aureus* resistentes a Meticilina e *Pseudomonas aeruginosa* resistentes a várias drogas foi confirmada por Radji et al. (2013).

Antunes et al. (2014) verificaram a ação dos extratos aquosos de chá verde na redução do número de *C. albicans* viáveis em biofilmes formados em resina acrílica, assim como o Listerine sem álcool.

O efeito da EGCG, um dos principais componentes do chá verde em inflamações alérgicas das vias aéreas foi estudado por Choi et al. (2014), que verificaram que a mesma reduziu a expressão de mucina em modelos de ratos com asma e em células do epitélio nasal de pacientes com inflamações alérgicas.

EGCG reduziu as citocinas inflamatórias e inibiu a expressão exacerbada das proteínas quinases ativadas por mitógenos (MAPKs), pois pesquisa realizada por Chen et al. (2015), observou a ação da EGCG na atenuação de mastite em ratos induzida por LPS (lipopolissacarídeo).

Em 2015, Cyboran et al. realizaram um estudo sobre a atividade biológica do chá verde em cápsulas, que continham 300 mg de polifenóis extraídos do chá verde. Este extrato apresentou atividade antioxidante e inibiu enzimas envolvidas na inflamação como a COX-1 (ciclooxigenase-1), a COX-2 (ciclooxigenase-2) e a lipoxigenase. Neste estudo, o extrato de chá verde modificou as propriedades físicas da membrana das hemácias, tais como: aumento da resistência, da fluidez e

da hidratação. Sendo assim, o chá verde foi anti-inflamatório e antioxidante *in vitro* sem causar efeito deletério em hemácias.

Outro estudo *in vitro* foi realizado por Marinovic et al. em 2015, que consistiu em avaliar o potencial tanto de uma mistura contendo as quatro principais catequinas presentes no chá verde, quanto de cada uma delas separadas como moduladores de parâmetros funcionais em neutrófilos humanos. Neste estudo, as quatro catequinas (EGCG, EGC, ECG e EC) sozinhas ou misturadas reduziram os parâmetros inflamatórios, pois houve o decréscimo da liberação de TNF- α , IL-1 β e IL-6 (interleucina-6).

Ramadan et al. (2015) estudaram a atividade anti-inflamatória dos extratos aquosos do chá verde *versus* chá preto em ratos com artrite reumatoide. Os animais foram divididos em 11 grupos, 10 grupos com artrite e 1 grupo de ratos saudáveis. Os grupos com artrite receberam via oral indometacina 1mg/kg ou extratos aquoso de chá verde ou chá preto. Em seguida, foi realizado o teste imunoenzimático (ELISA) que quantificou a produção das citocinas IL-1 β , TNF- α e IL-4 no soro. O grupo que recebeu 1g/kg de extrato aquoso de chá verde apresentou resultados semelhantes ao grupo que recebeu indometacina; em ambos os grupos, houve um significativo decréscimo na produção das citocinas pró-inflamatórias. Assim, o estudo mostrou que o chá verde apresentou atividade antiartrítica superior ao chá preto e semelhante à indometacina.

O efeito anti-inflamatório e analgésico do extrato alcoólico das folhas do chá verde em camundongos foi estudado por Mota et al. (2015). Quando administrados subcutaneamente, tanto 0,07 g/kg como 0,14 g/kg do extrato do chá verde inibiram a migração celular induzida por carragenina. Quando administrada por gavagem, somente 0,14 g/kg de chá verde foi eficiente. Estes resultados sugerem que o chá verde pode ser utilizado em inflamações crônicas.

Em 2015, Hrishi et al. realizaram um estudo clínico randomizado em pacientes com periodontite utilizando dentifrício com 1,4% do extrato de chá verde como um coadjuvante terapêutico. Por quatro semanas, os trinta pacientes com periodontite receberam a terapia periodontal não cirúrgica, ou seja, a raspagem e o alisamento radicular. Metade dos pacientes utilizou pasta dental contendo flúor e triclosan (grupo controle) e outra metade utilizou pasta com chá verde (grupo experimental). Como resultado o estudo citado mostrou que o grupo experimental apresentou melhora em relação ao outro grupo nos parâmetros analisados, tais como: índice de placa, profundidade à sondagem, nível clínico de inserção, sangramento à sondagem e atividade da glutathione s-transferase. Dessa forma, verificou-se que o dentifrício com extrato de chá verde pode servir como um coadjuvante terapêutico para tratamento da periodontite, sendo este resultado de grande interesse odontológico. Os estudos com chá verde são numerosos, embora, com extrato glicólico de chá verde, ainda são insuficientes, especialmente na área da Odontologia.

2.4 Aroeira-do-sertão (*Myracrodruon urundeuva* Allemão)

Myracrodruon urundeuva Allemão, popularmente conhecida como aroeira-do-sertão, é uma árvore que cresce no Nordeste do Brasil onde predomina a vegetação do cerrado e o clima semiárido. Esta espécie vegetal pertence à família Anacardiaceae.

Em 2013, Carlini et al. realizaram uma avaliação da toxicidade da aroeira-do-sertão e da aroeira-da-praia (*Schinus terebinthifolius*), ambas espécies pertencem à mesma família Anacardiaceae. Neste estudo, verificaram que quando administrados cronicamente, induziram má formação óssea na ninhada de ratas que

foram tratadas com estes extratos durante a gestação, havendo necessidade de verificar os riscos e benefícios da administração oral destas plantas por mulheres em idade fértil.

O efeito antimicrobiano do extrato etanólico das folhas da aroeira e do seu óleo essencial contra *Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus* de isolados clínicos foi pesquisado por Figueredo et al. (2014). A mínima concentração inibitória foi determinada por meio do ensaio de microdiluição e verificaram que o extrato etanólico de aroeira-do-sertão apresentou maior atividade antibacteriana que o seu respectivo óleo essencial e que este é mais efetivo em potencializar a atividade dos antibióticos contra *S. aureus* cepa 358.

Em 2014, Machado e Oliveira realizaram uma revisão sobre as ações farmacológicas da aroeira-do-sertão de interesse odontológico. Um gel tópico contendo casca de aroeira e óleo de alecrim pimenta foi aplicado na cavidade bucal em ratos com periodontite e estes tiveram preservação da reabsorção do osso alveolar. Outro estudo *in vitro* mostrou que o extrato hidroalcoólico de aroeira-do-sertão apresentou ação bactericida sobre *S. mutans*, e *Lactobacillus casei*, assim como sua ação antifúngica sobre *C. albicans*. Outra ação interessante foi a redução substancial da microbiota cariogênica nos animais experimentais.

Plantas medicinais de Pernambuco foram pesquisadas por Saraiva et al., em 2015, que observaram que os extratos de aroeira-do-sertão são obtidos através do preparo das folhas, raízes e cascas de galhos e de tronco. Nas cascas, foram isoladas chalconas diméricas: urundeuvina A, B e C e matosina. O modo de uso mais comum é a infusão das cascas em água pode ser usada via oral ou para banho de assento. As indicações terapêuticas são abrangentes como ação anti-inflamatória, ação expectorante, tratamento de gonorreia, úlceras bucais e doenças nas gengivas.

Em 2015, Carvalho et al. realizaram um estudo etnofarmacológico de plantas comercializadas para fins terapêuticos em mercados públicos no Nordeste do Brasil. Entre as 91 espécies pesquisadas, a aroeira-do-sertão ficou entre as 8 espécies mais versáteis quanto ao seu uso. O cozimento ou o molho das cascas da aroeira-do-sertão pode ser usado para tratamento de feridas na pele, inflamação, dor, comichão, cistite, uretrite, diarreia e cólicas abdominais.

Assim, a aroeira-do-sertão apresenta resultados interessantes em pesquisas envolvendo o controle de microrganismos relacionados à patologias bucais. No entanto, mais estudos são necessários para comprovar seu mecanismo de ação e estabelecer condições seguras para seu uso.

2.5 Alcachofra [*Cynara cardunculus* var. *scolymus* (L.) Fiori]

Cynara cardunculus var. *scolymus* (L.) Fiori. conhecida popularmente como alcachofra pertence à família Asteraceae. De acordo com Missouri Botanical Garden (Tropicos, 2016), esta espécie tem como basinômio *Cynara scolymus* L. A alcachofra é uma espécie perene e herbácea, sendo nativa da região mediterrânea.

Dentre as espécies de plantas escolhidas no presente estudo a alcachofra pertence a lista da RENISUS. Esta é constituída de espécies vegetais com potencial de avançar nas etapas da cadeia produtiva e de gerar produtos de interesse ao Sistema Único de Saúde (SUS) (Brasil, 2009).

Desde tempos antigos é apreciado como um prato saboroso com propriedades benéficas para saúde, este vegetal comestível é uma fonte de antioxidantes como inulina e cinarina (ácido monocafeoilquínico), este último tem propriedades hepatoprotetoras e

coleréticas. A parte comestível do vegetal é composta pelo receptáculo alargado e a base engrossada das brácteas na cabeça da inflorescência (Fissore et al., 2014).

Segundo o Formulário de Fitoterápicos da Farmacopéia Brasileira, a infusão de suas folhas secas são usadas via oral como antidiarréico, colerético e colagogo (Brasil, 2011).

De acordo com a bula de medicamentos fitoterápicos da ANVISA, as folhas são de grande utilidade por conter em sua composição até 2% de ácidos fenólicos (ácido cafeico, ácido clorogênico e cinarina), 4% de lactonas sesquiterpênicas e 0,5% de flavonóides, principalmente glicosídeos da luteolina (Brasil, 2015).

As substâncias responsáveis pela ação biológica de um extrato vegetal variam de acordo com a parte do vegetal coletado e o solvente utilizado para o processo de extração, conforme indicam os estudos seguintes.

Os efeitos anti-inflamatório e antioxidante foram analisados por Zapolska-Downar et al. (2002) que verificaram a ação antioxidante dos extratos aquosos e etanólicos de alcachofra em células endoteliais e monócitos.

Além dos efeitos antioxidantes, os efeitos antimicrobianos foram pesquisados por Zhu et al. (2004) que demonstraram num estudo preliminar a atividade antimicrobiana de extratos das folhas da alcachofra. O extrato concentrado foi fracionado sucessivamente com clorofórmio, acetato de etila e 1-butanol; em seguida, verificaram que os extratos de folha na fração com 1-butanol exibiram atividades antimicrobianas mais significativas contra diferentes microrganismos, tais como *C. albicans*, *C. lusitanea*, *S. aureus*, *E. coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Bacillus subtilis*. O solvente mais indicado neste experimento foi 1-butanol.

Em 2005, Zhu et al. pesquisaram a atividade antifúngica da alcachofra. Cada uma das partes da alcachofra (flor, folhas e caule)

foram submetidas à extração utilizando três tipos de solventes (clorofórmio, etanol e acetato de etila). Por meio destes, foram analisadas para cada um dos extratos a atividade antifúngica de 8 espécies de fungos (*C. albicans*, *C. lusitaniae*, *Saccharomyces cerevisiae*, *S. carlsbergensis*, *Aspergillus niger*, *Penicillium oxalicum*, *Muco mucedo* e *Cladosporium cucumerinum*). Os extratos das folhas e as frações com etanol foram as mais efetivas contra todos os fungos testados pelo método de difusão em placa de ágar. Neste estudo observa-se que as substâncias antimicrobianas podem estar em maior quantidade na região das folhas e estas substâncias podem ter maior solubilidade em etanol.

Os efeitos anti-inflamatórios e antitumorais de extratos metanólicos das flores da alcachofra em tumores induzidos por 12-O-tetra-decanoylphorbol-13-acetate (TPA) na pele de ratos foram verificados por Yasukawa et al. (2010).

Vários extratos de plantas foram triados para verificar seu possível efeito inibitório sobre a atividade do fator de transcrição nuclear kappa beta (NF-kB), o qual é ativado por raios ultravioleta e citocinas inflamatórias e induz a expressão de vários genes como fator de crescimento de fibroblastos e metaloproteinase da matriz-1 (MMP-1). Assim, de acordo com Tanaka et al. (2013) o extrato de alcachofra mostrou o maior efeito na supressão do fator NF-kB.

Em 2013, Gurel et al. compararam diversos cremes à base de ervas para tratamento de hemorroida em ratos. Estes animais receberam aplicação do óleo de cróton no ânus para causar inflamação no ânus; em seguida, foram tratados com creme ou solução salina 2 x ao dia por 15 dias. O grupo 1 recebeu solução salina, o grupo 2 recebeu creme com óleo de cróton, o grupo 3 recebeu creme com folhas de figueira, folhas de alcachofra e casca de noz e o grupo 4 recebeu creme com folhas de figueira, folhas de alcachofra, casca de noz e castanha. Assim, observou-se que o tratamento com os cremes a base de ervas demonstraram efeitos anti-inflamatórios e antioxidantes.

Estudos no desenvolvimento de frações pulverizadas de brácteas, corações e hastes da alcachofra enriquecidas com fibras solúveis foram realizados por Fissore et al. (2014). Assim, observou-se que todas as frações na concentração até 5000 µg/mL não apresentaram citotoxicidade em células Vero (células dos rins de macacos verdes africanos) por meio do ensaio de MTT, além disso, todas as frações apresentaram ação antiviral contra o vírus herpes simplex tipo 1.

Contudo, apesar destes resultados interessantes, são poucos os estudos com extrato glicólico de *C. cardunculus* var. *scolymus* (L.) Fiori candidato potencial para apresentar ação anti-inflamatória.

Diante da variedade de plantas e dos extratos obtidos destas, ainda são escassos os estudos sobre a ação citotóxica e anti-inflamatória dos extratos glicólicos de *C. sinensis*, de *M. urundeuva* e de *C. cardunculus* var. *scolymus*, é de grande interesse avaliar suas propriedades a fim de obter fitoterápicos e dentifrícios eficientes e com baixa toxicidade, visando à aplicabilidade clínica na área odontológica em enxaguatórios, pomadas, cremes, dentifrícios e soluções irrigantes dos canais radiculares.

3 PROPOSIÇÃO

O presente estudo buscou avaliar as seguintes atividades biológicas dos extratos glicólicos de *Camellia sinensis* (chá verde), *Myracrodruon urundeuva* (aroeira-do-sertão) e *Cynara cardunculus* L. var. *scolymus* (L.) Fiori (alcachofra):

- a) Atividade citotóxica sobre macrófagos de camundongo (RAW 264.7), em ensaio da atividade metabólica pelo método MTT;
- b) Atividade anti-inflamatória em macrófagos (RAW 264.7) estimulados por lipopolissacarídeo (LPS) de *Escherichia coli*, pela produção de citocinas pró-inflamatórias (IL-1 β , TNF- α) e de citocina anti-inflamatória (IL-10).

4 MATERIAL E MÉTODOS

Os experimentos foram realizados no laboratório de cultura celular do Instituto de Ciência e Tecnologia da UNESP. Os extratos glicólicos a 20% (200 mg/mL) selecionados foram:

- a) Extrato glicólico das folhas da *Camellia sinensis* (L.) Kuntze (chá verde);
- b) Extrato glicólico das cascas da *Myracrodruon urundeuva* Allemão (aroeira-do-sertão);
- c) Extrato glicólico das fFolhas da *Cynara cardunculus* L. var. *scolymus* (L.) Fiori (alcachofra).

O extrato de chá verde foi obtido da empresa Mapric e os extratos de alcachofra e aroeira-do-sertão foram obtidos da All Chemistry (São Paulo, SP), com os devidos laudos e especificações.

A cultura de macrófagos de camundongos (RAW 264.7) foi proveniente do Banco de Células do Rio de Janeiro - Associação Técnico Científica Paul Ehrlich (APABCAM – RJ).

4.1 Avaliação da citotoxicidade dos extratos

A ausência ou mínima toxicidade é uma das características que confere ao fitoterápico segurança na sua utilização. Na análise de um fitoterápico, este pode apresentar elevada citotoxicidade com eliminação total ou parcial de células cultivadas, ou

seja, exibir uma viabilidade celular abaixo de 50%. O ensaio de citotoxicidade é um procedimento que tem como objetivo avaliar a biocompatibilidade de um produto, ou seja, o quanto este pode ser tóxico para um tipo de célula. (Oliveira JR, 2011). No estudo desenvolvido nesta tese, estes produtos são extratos glicólicos vegetais.

A fim de pesquisar qual tipo de aplicação clínica mais se adequa aos extratos no estudo em questão, foram empregados 5 min e 24 h como tempo de exposição dos extratos nas células cultivadas.

Na prática, o tempo de exposição de um enxaguatório ou da pasta de dente na mucosa oral não ultrapassa 5 min, por isso é interessante observar a citotoxicidade dos extratos glicólicos vegetais neste tempo de exposição em macrófagos. O tempo de 24 h é comparável aos medicamentos de uso tópico que podem permanecer por um tempo mais prolongado na mucosa bucal.

O método de avaliação da toxicidade pelo uso do teste com MTT demonstra além do número de células em uma amostra, o nível de sua atividade metabólica. Sem contar, que é um método confiável, que se reproduz fácil e rapidamente em laboratório.

A avaliação da citotoxicidade dos diferentes extratos naturais (alcachofra, aroeira-do-sertão e chá verde) foi realizada por meio do teste colorimétrico com MTT [(Brometo de 3(4,5-dimetiltiazol-2-yl)2,5-difeniltetrazólio)] para analisar a atividade metabólica celular em culturas de macrófagos de camundongo (RAW 264.7).

A cultura de macrófagos foi cultivada em meio de Eagle modificado por Dulbecco (DMEM - LGC Biotecnologia, Cotia, Brasil), suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB) (Invitrogen, Nova York, EUA) e mantidas em frascos de cultivo celular (TPP, Suíça), incubadas em estufa à temperatura de 37°C, com umidade atmosférica a 5% de CO₂.

O meio de cultura foi trocado a cada 48 h e ao atingir o estado de subconfluência das células, caracterizado pela ocupação de

mais de 70% do frasco, as células foram utilizadas nos testes. Para tanto, a monocamada de células foi desagregada do assoalho do frasco de cultura com auxílio de um varredor celular, as células suspensas foram centrifugadas por 5 min à 5000 rpm. Em seguida, foi feito o teste de exclusão com pelo azul de Trypan, para quantificar o número de células viáveis em um contador automático (Counter Cell).

4.1.1 Ensaio de citotoxicidade com MTT

A análise da atividade metabólica das células viáveis foi realizada 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) estéril. A metodologia utilizada foi apresentada por Jesus et al. (2015).

Em microplacas de 96 poços (TPP) foram adicionados 200 µL de meio DMEM + 10% SFB contendo 2×10^4 células viáveis. Estas placas foram incubadas (37 °C, com 5% de CO₂) por 24 h para ocorrer aderência celular nos poços da microplaca.

Em seguida, o sobrenadante foi descartado e foram acrescentados 200 µL/poço do extrato em 11 concentrações diferentes na seguinte diluição seriada: 200 mg/mL, 100 mg/mL, 50 mg/mL, 25 mg/mL, 12,5 mg/mL, 6,25 mg/mL, 3,13 mg/mL, 1,56 mg/mL, 0,78 mg/mL, 0,39 mg/mL e 0,20 mg/mL. Os poços-controles continham apenas células com meio de cultura, ou seja, células sem estímulo com 0 mg/mL do extrato. A diluição seriada (de 200 mg/mL a 0,20 mg/mL) dos extratos naturais foi em meio DMEM + 10% SFB.

Cada um dos extratos testados apresentou 12 grupos experimentais com concentrações diferentes dos extratos (11 diluições e

controle), as diluições dos extratos foram 200 mg/mL; 100 mg/mL; 50 mg/mL; 25 mg/mL; 12,5 mg/mL; 6,25 mg/mL; 3,13 mg/mL; 1,56 mg/mL; 0,78 mg/mL; 0,39 mg/mL; 0,20 mg/mL, cada diluição representa um grupo com n=8, conforme figura 1 e todos os grupos foram testados em dois tempos de exposição (5 min e 24 h), em 3 extratos vegetais, formando 72 grupos, conforme o quadro 1. Os testes foram realizados em duplicata.

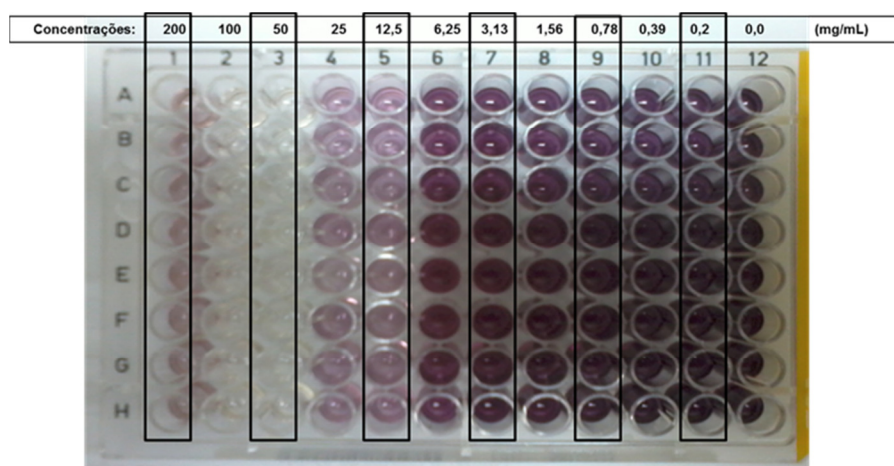


Figura 1 – Placa de 96 poços com 11 diluições seriadas do extrato glicólico de chá verde, após a absorção do sal de MTT utilizado para ensaio de citotoxicidade. A concentração 0,0 mg/mL refere-se ao grupo controle.

Após o período, o sobrenadante foi descartado, e os poços foram lavados com PBS para descartar as células mortas. Em seguida, para verificação da viabilidade da cultura, foram adicionados 100 μ L/poço da solução de MTT. As placas foram incubadas novamente (37 $^{\circ}$ C, com 5% de CO₂) por período de 1 h, abrigadas da luz.

Posteriormente, esta solução foi descartada e foram adicionados 100 μ L/poço de dimetilsulfóxido (DMSO – Sigma) para expor os cristais de formazina produzidos, após absorção do sal de MTT, por células viáveis, os poços que adquirem coloração roxa devido a presença dos cristais de formazina (Figura 1). Após incubação de 10 min na estufa

e agitação em *shaker*, por igual período, a absorbância dos poços foi lida em leitora de microplacas com comprimento de onda de 570 nm.

As densidades ópticas (DO) obtidas foram convertidas em percentual de viabilidade celular empregando-se a seguinte fórmula:

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

Quadro 1 – Identificação dos grupos para o teste de MTT para avaliar viabilidade celular

Extrato glicólico	Grupos	Tempo de exposição
chá verde	11 diluições* + controle	
aroeira-do-sertão	11 diluições* + controle	5 min e 24 h
alcachofra	11 diluições* + controle	

*As diluições dos extratos foram 200 mg/mL; 100 mg/mL; 50 mg/mL; 25 mg/mL; 12,5 mg/mL; 6,25 mg/mL; 3,13 mg/mL; 1,56 mg/mL; 0,78 mg/mL; 0,39 mg/mL; 0,20 mg/mL. O grupo controle corresponde a células sem estímulo.

4.2 Avaliação da atividade anti-inflamatória dos extratos

A avaliação da atividade anti-inflamatória foi realizada pelo método ELISA, seguindo metodologia de Oliveira JR et al. (2014). De acordo com os resultados obtidos no teste de citotoxicidade, as concentrações menos tóxicas de cada extrato foram escolhidas para realizar o ELISA. Tais concentrações foram de 3,13 mg/mL e 12,5 mg/mL para o extrato glicólico da chá verde e de aroeira-do-sertão e somente de 3,13 mg/mL para o extrato glicólico de alcachofra, conforme o quadro 2.

Em placas de 24 poços (TPP, Suíça) foram acrescentados $5 \cdot 10^5$ células viáveis por poço, sendo o volume completado com meio DMEM + 10% SFB para 1 mL.

As placas foram incubadas (37°C, com 5% de CO₂) por 24 h para aderência das células. Após este período, o meio foi removido e foram adicionados os extratos naturais nas concentrações menos tóxicas encontradas no teste de citotoxicidade.

Os períodos de exposição a cada extrato foram de 5 min e 24 h. As concentrações para o extrato de aroeira-do-sertão e de chá verde foram 3,13 mg/mL e 12,5 mg/mL. No grupo controle foi utilizado apenas meio DMEM acrescido de 10% SFB. Exceto no grupo controle, os outros grupos receberam o lipopolissacarídeo (LPS) de *Escherichia coli* (Sigma) na concentração de 1 µg/mL em cada poço para haver o estímulo da resposta inflamatória pelos macrófagos. Como mostra na placa de 24 poços, após 24 h do tempo de exposição de 5 min (Figura 2).

Após o período de exposição com os extratos e LPS (5 min e 24 h), o sobrenadante foi removido e foi acrescentado o meio DMEM acrescido de 10% SFB para 1 mL. As placas seguiram novamente para incubação por 24 h.

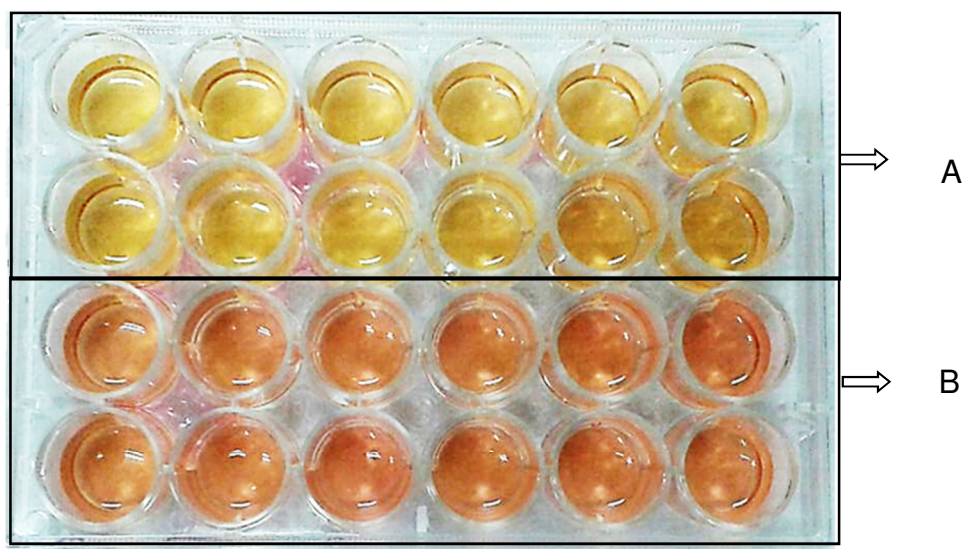


Figura 2 – Placa de 24 poços, após 24 h do tempo de exposição de 5 min. (A) Grupo que ficou exposto ao extrato e LPS. (B) Grupo controle- células sem estímulo.

Após 24 h, os sobrenadantes foram coletados, armazenados em microtubos e congelados em freezer (-20°C) para posterior quantificação de citocinas inflamatórias (IL-1 β e TNF- α) e anti-inflamatória IL-10, pelo teste imunoenzimático ELISA. Os testes foram em duplicata e cada grupo com n=12. Estes sobrenadantes formaram 14 grupos, conforme o quadro 2

Quadro 2 – Identificação dos grupos de sobrenadantes coletados das placas de 24 poços para posterior quantificação de citocinas

Extrato glicólico + LPS	Concentração	Tempo de exposição
chá verde	3,13 mg/mL	5 min
chá verde	12,5 mg/mL	
aroeira-do-sertão	3,13 mg/mL	
aroeira-do-sertão	12,5 mg/mL	
alcachofra	3,13 mg/mL	
controle	sem extrato e sem LPS	
LPS	só com LPS	
chá verde	3,13 mg/mL	24 h
chá verde	12,5 mg/mL	
aroeira-do-sertão	3,13 mg/mL	
aroeira-do-sertão	12,5 mg/mL	
alcachofra	3,13 mg/mL	
controle	sem extrato e sem LPS	
LPS	só com LPS	

4.2.1 Ensaio imunoenzimático ELISA

Placas de microtitulação de 96 poços (Nunc) foram sensibilizadas com anticorpos de captura anti-TNF- α ou anti-IL-1 β ou anti-IL-10 de camundongo (R&D Systems, NE) e mantidas *overnight* em temperatura ambiente.

No dia seguinte, as placas foram lavadas com 300 μ L de tampão de lavagem que consiste em PBS contendo Tween 20 a 0,5% (PBS-T) por três vezes com auxílio de um pipetador multicanal. Em seguida, as placas foram bloqueadas com tampão de bloqueio (para detecção de IL-1 β o PBS foi acrescido de 0,1% de Soro Albumina Bovino – BSA e para detecção de IL-10 e TNF- α o PBS foi acrescido de 1% de BSA). As placas foram mantidas em temperatura ambiente por 1 h .

Após 1 h, as placas foram lavadas com PBS-T(300 μ L por 3 vezes) e receberam os sobrenadantes da cultura de células (100 μ L por poço) e os padrões das citocinas com concentrações conhecidas (curva-padrão). Os testes foram realizados em duplicata, n=12 para cada grupo. As placas foram mantidas em temperatura ambiente por 2 h.

Após este período, as placas foram lavadas com PBS-T (300 μ L por 3 vezes) e foram acrescentados em cada poço das placas 100 μ L de anticorpos de detecção anti-TNF- α ou anti-IL-1 β ou anti-IL-10 marcados com biotina. As placas foram mantidas em temperatura ambiente por 2 h.

Em seguida, 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 mantidas em temperatura ambiente por 20 min

Após este período, as placas foram lavadas com PBS-T (300 μ L por 3 vezes) e 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. As placas foram mantidas, cobertas com papel alumínio, à temperatura ambiente por 20 min.

Logo após, foram adicionados 50 μ L da solução de parada para bloquear a reação (ácido sulfúrico 2N) (Figura 3). As placas foram imediatamente levadas ao leitor de microplacas (Biotek) com comprimento de onda de 450 nm para obter as densidades ópticas (DO).

Após obtenção das DO foram determinados os níveis de IL-1 β , TNF- α e IL-10 (pg/mL) das amostras de sobrenadantes celulares com auxílio do programa GraphPad Prism 5.0. Os grupos formados após a quantificação de citocinas estão estabelecidos no quadro 3

Quadro 3 – Identificação dos grupos para o teste de ELISA para avaliar atividade anti-inflamatória dos extratos glicólicos

Grupos	Extrato glicólico(conc.) + LPS	Citocinas
Experimental *	CV(3,13 mg/mL) ARO(3,13 mg/mL) ALC(3,13 mg/mL)	IL-10
	CV(3,13 mg/mL) CV(12,5 mg/mL) ARO(3,13 mg/mL) ARO(12,5 mg/mL) ALC(3,13 mg/mL)	IL-1 β
		TNF- α
CON*	—————	IL-10 IL-1 β TNF- α
LPS*	Apenas LPS	IL-10 IL-1 β TNF- α

ARO (aroeira-do-sertão, *M. urundeuva* Allem.); CV [chá verde, *C. sinensis* (L.)Kuntze]; ALC (alcachofra, *C. scolymus* L.); CON (controle- células sem estímulo). *Todos os grupos foram testados em dois tempos de exposição (5 min e 24 h).

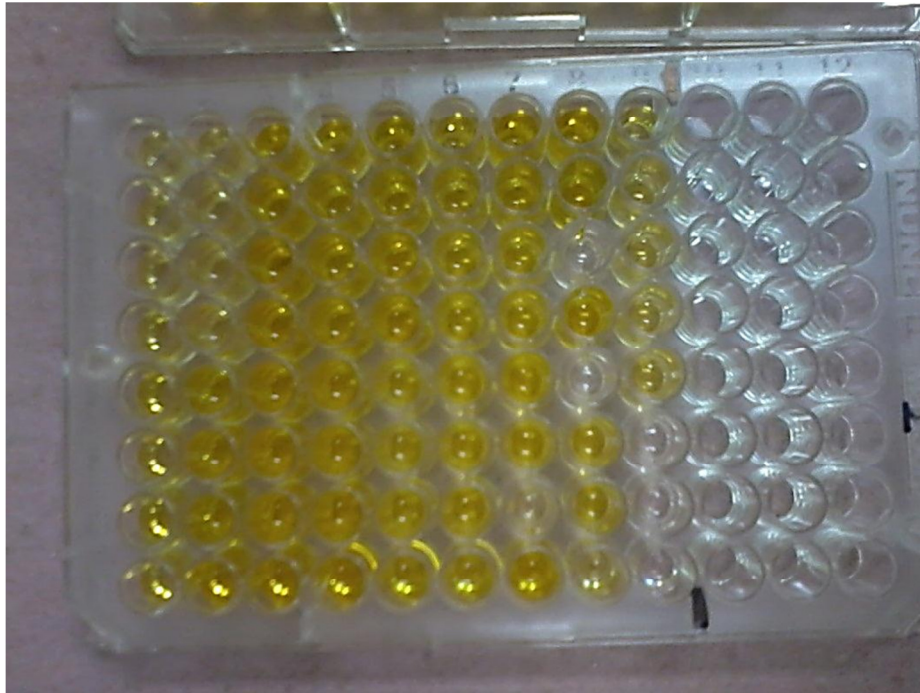


Figura 3 - Placa de 96 poços com os sobrenadantes das células que foi submetida ao ELISA para quantificação de IL-1 β , nesta última etapa foi adicionado o ácido sulfúrico 2 N para o bloqueio da solução revelada.

4.3 Análise estatística

Os resultados foram submetidos à análise de variância ANOVA, complementado pelo Teste de Tukey, com nível de significância de 5% ($p \leq 0.05$), utilizando o programa Graph prism.

5 RESULTADOS

A citotoxicidade dos extratos glicólicos vegetais foi verificada por meio do ensaio com MTT em macrófagos RAW 264.7. O potencial citotóxico de cada um dos extratos nas concentrações de 0,20 mg/mL a 200 mg/mL representou um grupo, cada grupo com $n=8$, assim foi obtida a média e o desvio padrão das 8 amostras e realizado a análise estatística. Os resultados foram apresentados na forma de gráficos, sendo um gráfico para cada extrato glicólico (chá verde, aroeira-do-sertão e alcachofra) testado num determinado tempo (5 min e 24 h). Os gráficos representaram os resultados do ensaio de citotoxicidade e correspondem as figuras 4 a 9. Sendo que as figuras 4 a 6 correspondem a citotoxicidade dos extratos no tempo de exposição de 5 min e as figuras 7 a 9 correspondem a citotoxicidade dos extratos no tempo de exposição de 24 h.

Em relação ao extrato glicólico de chá verde, pode-se observar que todas as concentrações analisadas foram estatisticamente semelhantes ao grupo controle, células sem estímulo do extrato ($p > 0,05$), não apresentaram citotoxicidade (Figura 4).

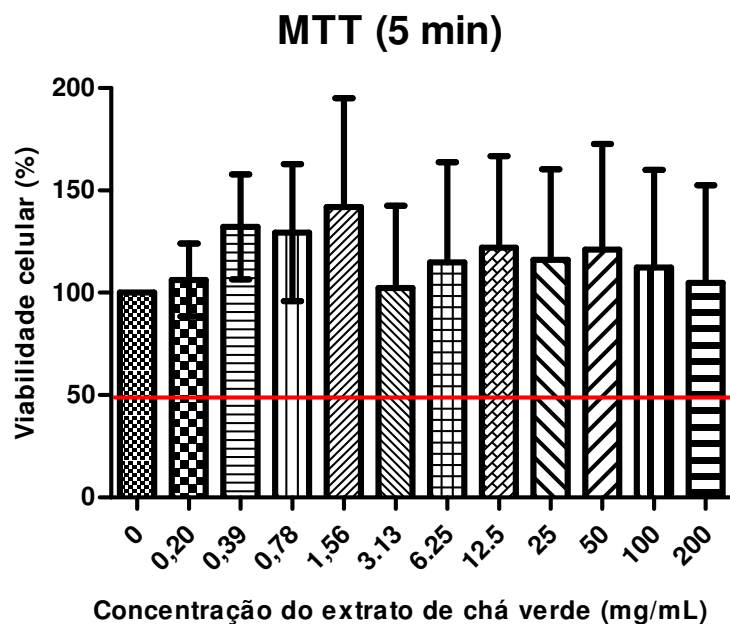


Figura 4 - Viabilidade celular (%) apresentada por células sem estímulo (0 mg/mL) e tratadas por 5 min com chá verde (n = 8). ANOVA e Teste de Tukey ($p \leq 0,05$).

O extrato de aroeira-do-sertão apresentou o menor percentual de células sobreviventes na concentração de 200 mg/mL, tendo em média 70% de viabilidade celular, sendo estatisticamente diferentes dos grupos tratados com 100 mg/mL, 50 mg/mL e 12,5 mg/mL ($p \leq 0,05$). As demais concentrações, inclusive a concentração do grupo controle, apresentaram viabilidade celular estatisticamente semelhantes ao grupo tratado com 200mg/mL do extrato ($p > 0,05$) (Figura 5).

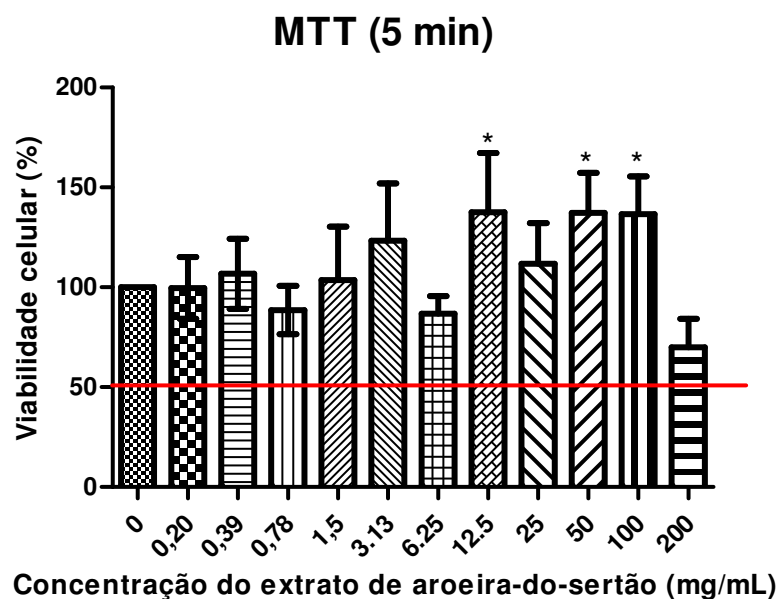


Figura 5 - Viabilidade celular (%) apresentada por células sem estímulo (0 mg/mL) e tratadas por 5 min com aroeira-do-sertão (n = 8). ANOVA e Teste de Tukey. (*) indica diferença estatisticamente significativa em relação ao controle (0mg/mL) ($p \leq 0,05$).

A concentração do extrato glicólico de alcachofra com menor percentual de células sobrevivente foi a do grupo tratado com 200 mg/mL, apresentado em média 18% de viabilidade celular. Esta concentração foi citotóxica, pois apresentou viabilidade celular abaixo de 50%, sendo estatisticamente diferente dos grupos tratados bem como do grupo controle ($p \leq 0,05$). As concentrações do extrato que não apresentaram diferença estatística nos valores de viabilidade celular foram 0,20 mg/mL e 0,39 mg/mL ($p > 0,05$) (Figura 6).

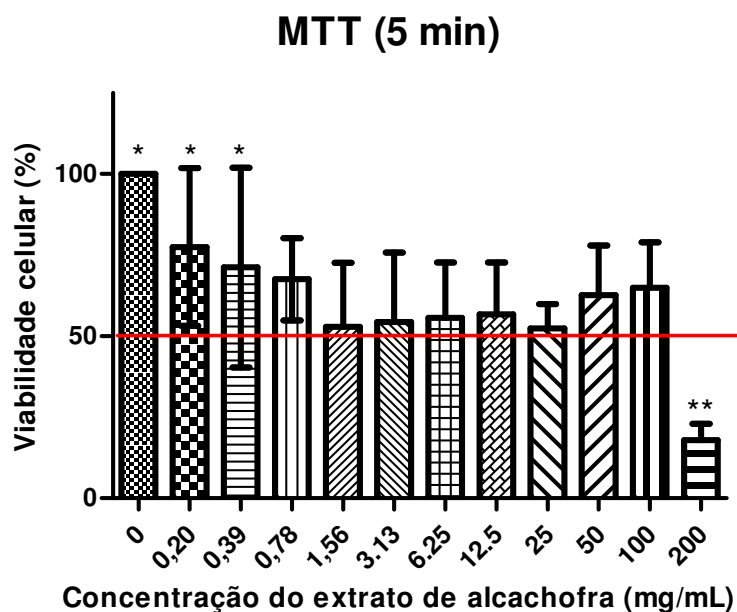


Figura 6 - Viabilidade celular (%) apresentada por células sem estímulo (0 mg/mL) e tratadas por 5 min com alcachofra (n = 8). ANOVA e Teste de Tukey. (*) e (**) indicam diferença estatisticamente significativa em relação ao controle (0 mg/mL) ($p \leq 0,05$).

Com relação ao tempo de contato de 24 h, o chá verde apresentou viabilidade celular abaixo de 50%, nas concentrações de 50 mg/mL, 100 mg/mL e 200 mg/mL. Estas apresentaram viabilidade celular em torno de: 9,98%, 10,53% e 14,98%, respectivamente, indicando serem citotóxicas. Além disso, os valores de viabilidade celular dos grupos tratados com tais concentrações tiveram diferença estatística significativa em relação ao grupo controle ($p \leq 0,05$). As demais concentrações apresentaram valores sem diferença estatística em relação ao grupo controle ($p > 0,05$) (Figura 7).

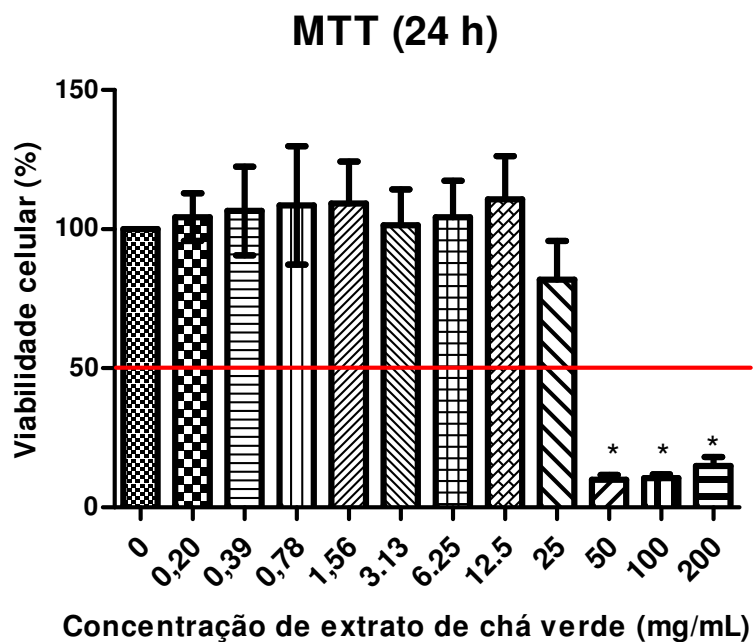


Figura 7 - Viabilidade celular (%) apresentada por células sem estímulo (0 mg/mL) e tratadas por 24 h com chá verde (n = 8). ANOVA e Teste de Tukey.^(*) indica diferença estatisticamente significativa em relação ao controle (0 mg/mL) ($p \leq 0,05$).

Após 24 h de exposição do extrato de aroeira-do-sertão, todos os grupos demonstraram valores de viabilidade celular superiores a 50%, não indicando serem citotóxicos em todas as concentrações analisadas. Os menores valores de viabilidade celular: 56,74%, 52,89% e 57,41% correspondem respectivamente aos grupos tratados com 50 mg/mL, 100 mg/mL e 200 mg/mL do extrato. Tais concentrações apresentaram diferença estatística significativa em relação ao grupo controle ($p \leq 0,05$). As concentrações de 12,5 mg/mL a 0,39 mg/mL demonstraram valores de viabilidade celular acima de 140%, com diferença estatística em relação ao grupo controle ($p \leq 0,05$) (Figura 8).

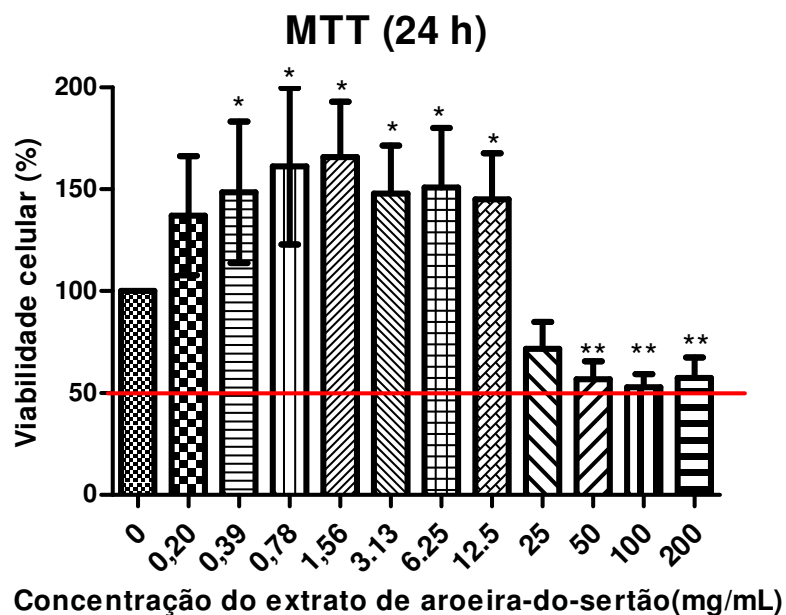


Figura 8 - Viabilidade celular (%) apresentada por células sem estímulo (0 mg/mL) e tratadas por 24 h com aroeira-do-sertão (n = 8). ANOVA e Teste de Tukey. (*) e (**) indicam diferença estatisticamente significativa em relação ao controle (0 mg/mL) ($p \leq 0,05$).

O extrato de alcachofra, após 24 h de contato com as células, apresentou nas concentrações de 12,5 mg/mL a 200 mg/mL, valores de viabilidade celular menores que 50%, indicando que tais concentrações são citotóxicas. Os valores de viabilidade celular destas concentrações apresentaram diferença estatisticamente significativa em relação ao grupo controle ($p \leq 0,05$). As concentrações de 0,20 mg/mL a 6,25 mg/mL apresentaram valores de viabilidade sem diferença estatisticamente significativa em relação ao grupo controle ($p > 0,05$) (Figura 9).

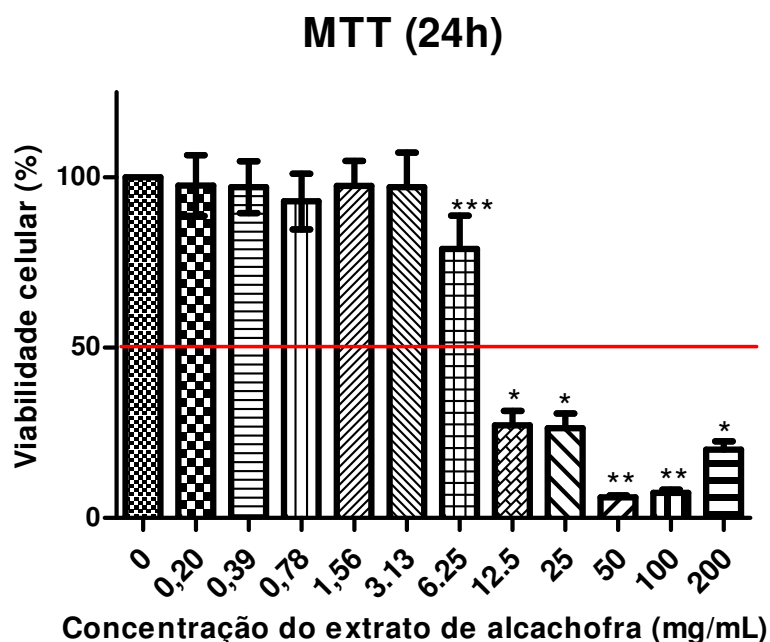


Figura 9 - Viabilidade celular (%) apresentada por células sem estímulo (0 mg/mL) e tratadas por 24 h com alcachofra (n = 8). ANOVA e Teste de Tukey. (*), (**) e (***) indicam diferença estatisticamente significativa em relação ao controle (0 mg/mL) ($p \leq 0,05$).

Na figura 10, estão demonstrados os resultados relacionados ao chá verde nos tempos exposição de 5 min e 24 h para quantificação de TNF- α , com as diferenças estatisticamente significativas representadas ($p \leq 0,05$).

Na quantificação de produção de TNF- α dos grupos que receberam chá verde no tempo de exposição de 5 min, obteve-se os seguintes resultados: o grupo que recebeu extrato e LPS apresentou redução da produção de citocina em relação ao grupo que só recebeu LPS. Houve menor produção de TNF- α com o aumento da concentração do extrato (Figura 10A). No tempo de exposição de 24 h, na quantificação de produção de TNF- α , houve uma redução na produção de TNF- α nos grupos que receberam o extrato e LPS em relação ao grupo que apenas recebeu LPS. Neste tempo de exposição, não houve diferença estatisticamente significativa entre as duas concentrações de chá verde ($p > 0,05$) (Figura 10B).

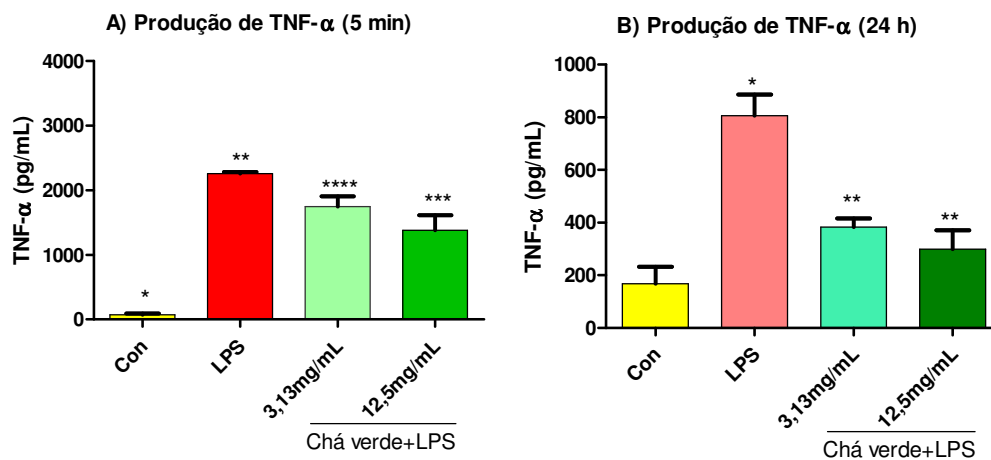


Figura 10 - Valores médios de TNF- α (pg/mL) e desvios padrão para cada grupo experimental, nos tempos de 5 min ou 24 h (Con = Controle) (n = 12). ANOVA e Teste de Tukey. (*), (**) e (****) indicam diferença estatisticamente significativa ($p \leq 0,05$).

Na figura 11, estão demonstrados os resultados relacionados ao chá verde nos tempos de exposição de 5 min e 24 h para quantificação de IL-1 β , com as diferenças estatisticamente significativas representadas ($p \leq 0,05$).

No tempo de exposição de 5 min, na quantificação de IL-1 β , observou-se que houve uma menor indução na produção de IL-1 β nos grupos que receberam o extrato com LPS em relação ao grupo que apenas recebeu LPS e quanto maior a concentração de chá verde menor foi a produção de IL-1 β (Figura 11A). No tempo de exposição de 24 h, entre o grupo controle e o grupo que recebeu chá verde 12,5 mg/mL com LPS não houve diferença estatisticamente significativa na quantificação de IL-1 β ($p > 0,05$) (Figura 11B).

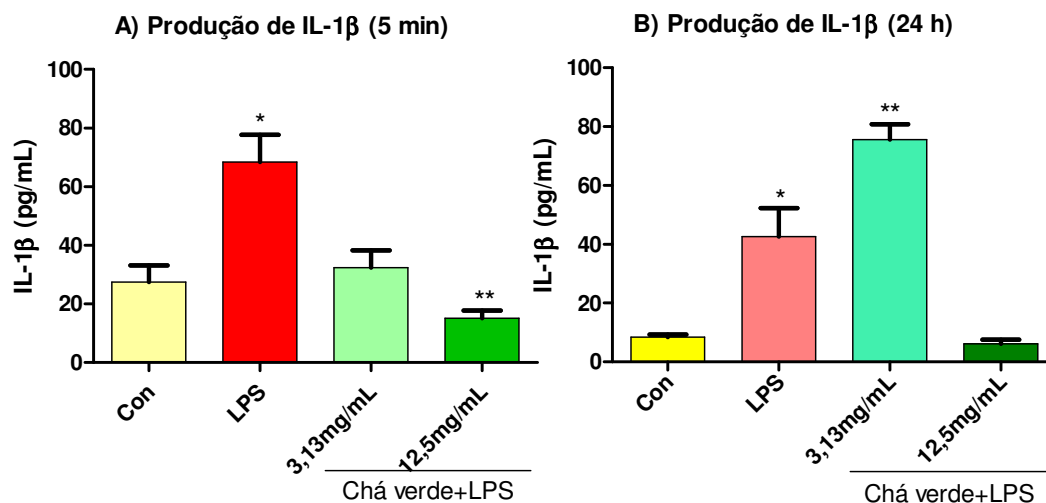


Figura 11 - Valores médios de IL-1 β (pg/mL) e desvios padrão para cada grupo experimental, nos tempos de 5 min ou 24 h (Con = Controle) (n = 12). ANOVA e Teste de Tukey. (*), (**) e (***) indicam diferença estatisticamente significativa ($p \leq 0,05$).

Na figura 12, estão demonstrados os resultados relacionados a aroeira-do-sertão nos tempos exposição de 5 min e 24 h para quantificação de TNF- α , com as diferenças estatisticamente significativas representadas ($p \leq 0,05$).

O extrato de aroeira-do-sertão apresentou resultados interessantes na quantificação de TNF- α no tempo de exposição de 5 min. Ambos os grupos com o extrato mais LPS apresentaram um aumento superior ao dobro com relação ao grupo apenas estimulado com LPS (Figura 12A). No tempo de exposição de 24 h, não houve diferença estatística significativa entre o grupo apenas estimulado com LPS e o grupo estimulado com aroeira-do-sertão 3,13 mg/mL e LPS ($p > 0,05$). O grupo estimulado com 12,5 mg/mL de aroeira-do-sertão e LPS produziu mais que o dobro de TNF- α em relação ao grupo LPS (Figura 12B).

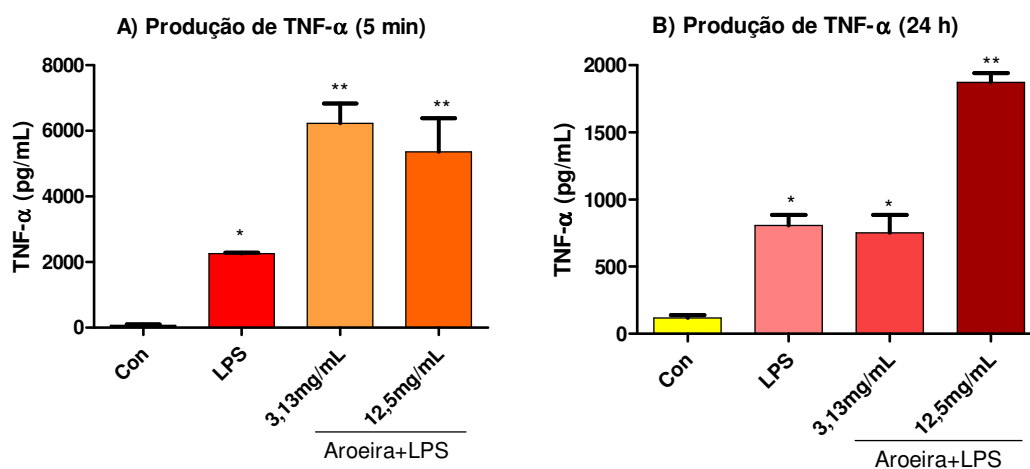


Figura 12 - Valores médios de TNF- α (pg/mL) e desvios padrão para cada grupo experimental, nos tempos de 5 min e 24 h (Con = Controle, Aroeira = Aroeira-do-sertão) (n = 12). ANOVA e Teste de Tukey. (*) e (**) indicam diferença estatisticamente significativa ($p \leq 0,05$).

Na figura 13, estão demonstrados os resultados relacionados ao extrato de aroeira-do-sertão nos tempos exposição de 5 min e 24 h para quantificação de IL-1 β , com as diferenças estatisticamente significativas representadas ($p \leq 0,05$).

No tempo de 5 min, houve uma redução da produção de IL-1 β proporcional as concentrações de aroeira-do-sertão. O grupo aroeira-do-sertão 12,5 mg/mL com LPS não apresentou diferença estatística em relação ao controle ($p > 0,05$) (Figura 13A). No tempo de 24 h, a produção de IL-1 β no grupo aroeira-do-sertão 12,5 mg/mL com LPS produziu 18 vezes mais citocina que o grupo LPS, com diferença estatística ($p \leq 0,05$). O grupo aroeira-do-sertão 3,13 mg/mL com LPS produziu 9 vezes mais IL-1 β que o grupo LPS, com diferença estatística ($p \leq 0,05$). Não houve diferença estatística entre o grupo estimulado com LPS e o grupo controle ($p > 0,05$) (Figura 13B).

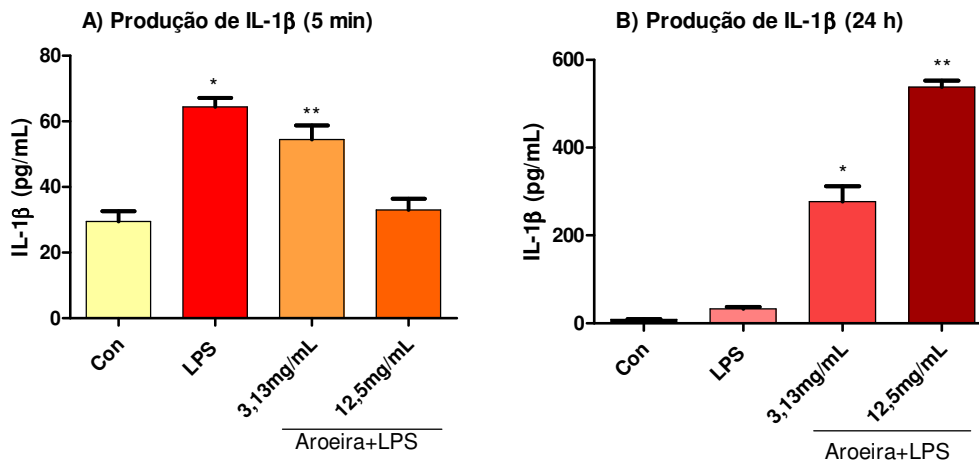


Figura 13 - .Valores médios de IL-1 β (pg/mL) e desvios padrão para cada grupo experimental, nos tempos de 5 min e 24 h (Con = Controle, Aroeira = Aroeira-do-sertão) (n = 12). ANOVA e Teste de Tukey. (*) e (**) indicam diferença estatisticamente significativa ($p \leq 0,05$).

Na figura 14, estão demonstrados os resultados relacionados a alcachofra nos tempos exposição de 5 min e 24 h para quantificação de TNF- α , com as diferenças estatisticamente significativas representadas ($p \leq 0,05$).

Os resultados com o extrato de alcachofra apresentaram no tempo de exposição de 5 min um aumento na produção de TNF- α em relação ao grupo controle e grupo que recebeu somente com estímulo do LPS (Figura 14A). No tempo de exposição de 24 h, não houve diferença estatística entre o grupo com alcachofra com LPS e o grupo somente com LPS na produção de TNF- α ($p > 0,05$) (Figura 14B).

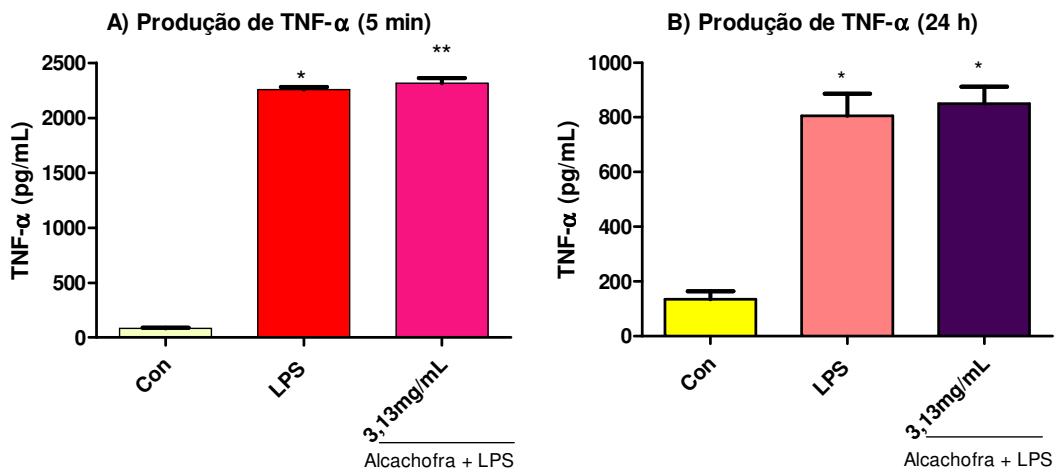


Figura 14 - Valores médios de TNF- α (pg/mL) e desvios padrão para cada grupo experimental, nos tempos de 5 min ou 24 h (Con = Controle) (n = 12). ANOVA e Teste de Tukey. (*) e (**) indicam diferença estatisticamente significativa ($p \leq 0,05$).

Na figura 15, estão demonstrados os resultados relacionados a alcachofra nos tempos exposição de 5 min e 24 h para quantificação de IL-1 β , com as diferenças estatisticamente significativas representadas ($p \leq 0,05$).

O grupo estimulado com extrato de alcachofra mais LPS apresentou valores semelhantes ao grupo controle na produção de IL-1 β , de modo que promoveu uma redução significativa desta citocina em relação ao grupo LPS, no tempo de exposição de 5 min (Figura 15A). No tempo de exposição de 24 h, o grupo com alcachofra e LPS apresentou um aumento 7 vezes superior com relação ao grupo LPS na produção de IL-1 β (Figura 15B).

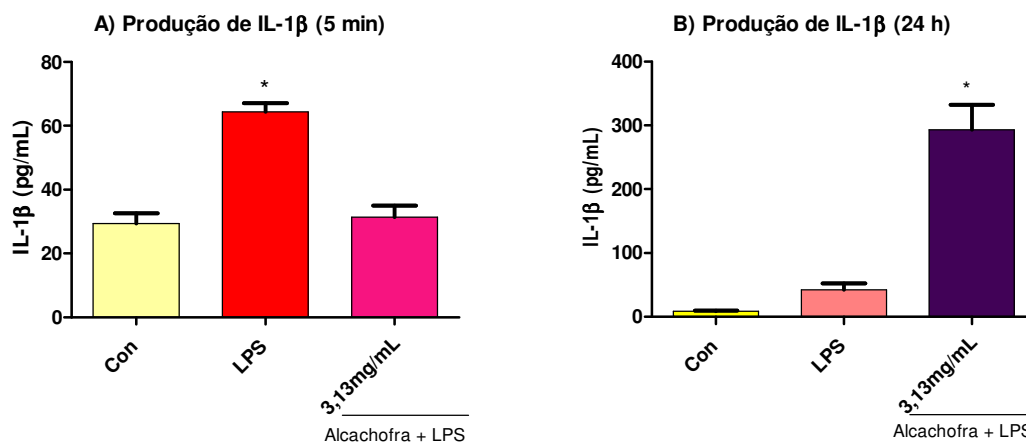


Figura 15 - Valores médios de IL-1 β (pg/mL) e desvios padrão para cada grupo experimental, nos tempos de 5 min ou 24 h (Con = Controle) (n = 12). ANOVA e Teste de Tukey. (*) e (**) indicam diferença estatisticamente significativa ($p \leq 0,05$).

Na figura 16, estão demonstrados os resultados relacionados produção de IL-10 pelos 3 extratos nos tempos exposição de 5 min e 24 h, com as diferenças estatisticamente significativas representadas ($p \leq 0,05$).

Com relação a produção de IL-10, todos os sobrenadantes eram de células que receberam extratos na concentração de 3,13 mg/mL e foram estimuladas com LPS. Tanto no tempo de 5 min como no tempo de 24 h, todos os grupos apresentaram maior produção de IL-10 que o grupo controle. Assim no tempo de exposição de 5 min, todos os grupos com extratos e LPS apresentaram produção de IL-10 maiores que o grupo LPS, com diferença estatística em relação ao grupo com LPS e o grupo controle ($p \leq 0,05$). (Figura 16A). No tempo de exposição de 24 h, todos os grupos com extratos e LPS apresentaram valores de IL-10 menores que o grupo LPS e maiores que o grupo controle (Figura 16B).

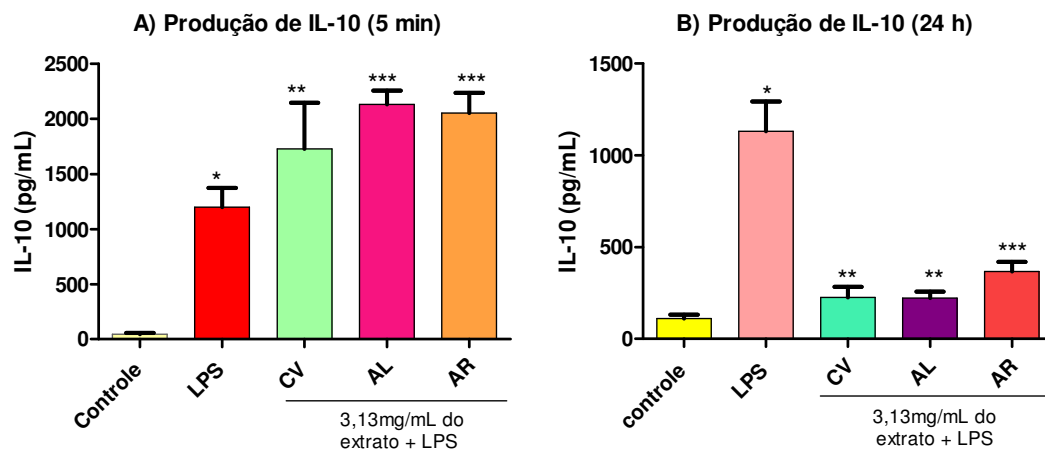


Figura 15 - Valores médios de IL-10 (pg/mL) e desvios padrão para cada grupo experimental, nos tempos de 5 min ou 24 h (CV = chá verde, AL = alcachofra, AR = aroeira) (n = 12). ANOVA e Teste de Tukey. (*) e (**) indicam diferença estatisticamente significativa ($p \leq 0,05$).

6 DISCUSSÃO

A utilização de constituintes derivados de plantas na área farmacêutica tem avançado rapidamente, devido à sua grande variedade de propriedades medicinais e toxicidade mínima comparada a drogas sintéticas. O conhecimento popular tradicional, indicam ações terapêuticas interessantes para o chá verde, a aroeira-do-sertão e a alcachofra, porém tais indicações necessitam de mais estudos para comprovar sua eficácia e sua segurança.

Durante a avaliação da citotoxicidade pelo teste com MTT, no tempo de exposição de 5 min, somente a concentração de alcachofra, 200 mg/mL, apresentou citotoxicidade, as demais concentrações dos três extratos obtiveram valores de viabilidade celular maiores do que 50%.

Jesus et al., em 2015, realizaram o teste com MTT com tempo de exposição de 5 min do extrato glicólico de abacateiro e observou que, em concentrações de 25 mg/mL ou menores, a viabilidade celular foi superior a 75%. Nossos resultados demonstraram que na mesma concentração (25 mg/mL) os extratos apresentaram os seguintes valores de viabilidade celular: alcachofra 52%, aroeira 111% e chá verde 116%. Assim, apenas o extrato de alcachofra apresentou viabilidade celular menor do que o abacateiro na concentração de 25 mg/mL.

No presente estudo, a mesma concentração de 50 mg/mL para todos os extratos de alcachofra, de chá verde e de aroeira-do-sertão, a viabilidade foi respectivamente em torno de 63%, 122% e 137%. Portanto, os resultados sugerem que o chá verde e a aroeira-do-sertão estimularam a proliferação dos macrófagos, aumentando sua viabilidade celular no tempo de exposição de 5 min.

No tempo de exposição de 24 h, nas concentrações de 0,20 mg/mL a 12,5 mg/mL do chá verde a viabilidade celular foi superior a 100%. Cyboran et al. (2015), mostraram que na concentração de $5,93 \pm 0,18 \mu\text{g/mL}$ de chá verde houve 50% de inibição da peroxidação lipídica nas membranas das hemácias. O estímulo da proliferação dos macrófagos pode estar relacionada a atividade antioxidante do chá verde, analisada por Cyboran et al. (2015), supondo que após o estímulo do LPS nos macrófagos, estes dão início a uma série de reações químicas que desencadeiam o processo inflamatório. Neste processo, há formação de substâncias reativas de oxigênio que causam estresse oxidativo, este é neutralizado pela ação de antioxidantes presentes no chá verde. Assim, o chá verde promoveu um aumento do número de macrófagos viáveis em relação ao grupo sem o extrato, promovendo a integridade celular destes.

No tempo de exposição de 24 h, entre os extratos de alcachofra, de chá verde e de aroeira-do-sertão, este último apresentou viabilidade celular superior a 50% em todas as concentrações analisadas. Além disso, as concentrações de 0,20 mg/mL a 12,5 mg/mL do extrato de aroeira-do-sertão apresentaram viabilidade celular acima de 100%, demonstrando estímulo na proliferação celular de macrófagos.

Estes resultados concordam com Ribas et al. (2006), que verificaram que o uso tópico de extrato das folhas de aroeira-da-praia (*S. terebinthifolius*) em mucosa bucal de ratos, promoveu maior proliferação vascular e fibroblástica em relação ao grupo controle.

Estevão et al. (2013, 2015) verificaram importante papel do extrato de aroeira-da-praia em acelerar o processo de cicatrização em feridas da pele de ratos, com aumento do número de fibroblastos, fibras colágenas e mastócitos. Tanto os mastócitos quanto os macrófagos estão no tecido conjuntivo e participam das respostas inflamatórias, assim a aroeira-da-praia poderia aumentar o número de macrófagos. Como a aroeira-da-praia pertence a mesma família da aroeira-do sertão,

esta pode conter também substâncias que favorecem imunidade do organismo. Assim, o extrato de aroeira-do-sertão pode ser usado em medicamentos de uso tópico que permanecem mais tempo na mucosa oral favorecendo a cicatrização de feridas.

Com relação à citotoxicidade no tempo de exposição de 24 h, comparando os valores da viabilidade celular dos três extratos na concentração de 12,5 mg/mL, a aroeira-do-sertão apresentou $145,08 \pm 22,72\%$, o chá verde $110,63 \pm 15,74\%$ e a alcachofra $27,27 \pm 4,16\%$. Assim a aroeira-do-sertão favoreceu a proliferação celular e o extrato de alcachofra foi o único que apresentou citotoxicidade, com viabilidade celular bem abaixo de 50% .

No tempo de exposição de 24 h, observaram-se valores citotóxicos para o extrato de chá verde em concentrações iguais ou acima de 50 mg/mL e, para o extrato de alcachofra, em concentrações iguais ou acima de 12,5 mg/mL.

Na concentração de 6,25 mg/mL do extrato de alcachofra, a viabilidade celular ficou em torno de 78,98% no tempo de exposição de 5 min e 55,63% no tempo de exposição de 24 h. Estes resultados estão de acordo com o ensaio de citotoxicidade por meio do MTT, realizado por Fissore et al. (2014), que apresentou ausência de citotoxicidade em células Vero até a concentração máxima testada de 5000 μ g/mL das frações pulverizadas de várias partes da alcachofra.

No tempo de exposição de 24 h, as viabilidades celulares na concentração de 50 mg/mL de aroeira-do-sertão, chá verde e alcachofra são respectivamente 56,74%, 9,98% e 6,08%, comparando com o extrato de bardana pesquisado por Oliveira JR et al. (2014), esta apresentou maiores valores de viabilidade celular (acima de 93%) em concentrações de 250 a 31,3 mg/mL, indicando menor citotoxicidade da bardana em relação aos extratos do nosso estudo.

Os estudos de citotoxicidade de produtos naturais, como os extratos glicólicos das plantas por tempo de exposição de 24 h, são

interessantes para formulações de medicamentos de uso tópico na mucosa bucal como as pomadas anti-inflamatórias.

De acordo com os resultados deste estudo, pode-se concluir que a citotoxicidade dos extratos é dose e tempo dependentes, ou seja, o aumento do tempo de exposição e da concentração dos extratos glicólicos vegetais favorece a redução do número de células viáveis. Tan et al. (2015), que realizaram teste de citotoxicidade por meio do ensaio de MTT em macrófagos RAW 264.7 expostos por 24 h a diluições seriadas do extrato hidroetanólico das flores da *Moringa oleífera* e obteve resultados semelhantes, a medida que a concentração do extrato aumentava o número de células viáveis reduzia.

No tempo de contato de 5 min apenas a alcachofra na concentração de 200 mg/mL foi citotóxica. No tempo de 24 h, o extrato de aroeira-do-sertão não apresentou citotoxicidade em nenhuma das concentrações analisadas e o extrato de alcachofra apresentou menores valores de viabilidade celular que o chá verde. Assim, torna-se de grande interesse que estudos com extratos glicólicos sejam ampliados para direcionar seu uso terapêutico nas concentrações não citotóxicas.

A ação anti-inflamatória foi avaliada em células de macrófagos RAW 264.7 estimulados por LPS de *E. coli*, um potente agente inflamatório utilizado em diversos estudos que analisaram ação anti-inflamatória de extratos vegetais (Martinez-Elizalde et al., 2015; Hong et al., 2015; Marinovic et al., 2015; Oliveira JR et al., 2014; Tan et al., 2015).

O macrófago RAW 264.7 é um excelente modelo para verificar se um extrato vegetal apresenta ação anti-inflamatória, pois mediante o estímulo com LPS, estes produzem e liberam citocinas pró-inflamatórias como IL-1 β , IL-6, IL-12 e TNF- α e/ou citocina reguladora anti-inflamatória IL-10.

Dentre as citocinas liberadas em resposta ao LPS, destacam-se as citocinas TNF- α e IL-1 β , pois ativam os osteoclastos que

são essenciais no processo de reabsorção óssea podendo causar alterações na região periapical da boca (Oliveira LD et al., 2012).

O TNF- α favorece o aumento da permeabilidade vascular e o recrutamento de novos macrófagos e neutrófilos para o local de uma infecção. Esta citocina está envolvida na resposta imunitária a microrganismos como bactérias, vírus, fungos e parasitas, além de ocasionar necrose de tumores (Jorjão, 2012)

A citocina IL-1 β tem um papel importante para defesa do hospedeiro em resposta a infecção, é pró-inflamatória e produzida e secretada por diversas células, como monócitos e macrófagos (Oliveira FE, 2013).

A citocina IL-10 tem o papel regulatório de controle da resposta anti-inflamatória, atua inibindo a produção de mediadores pró-inflamatórios nos macrófagos (Oliveira FE, 2013).

Assim, no presente estudo verificamos a produção de TNF- α , IL-1 β e IL-10 em macrófagos estimulados por LPS e por LPS com extratos vegetais para analisar a ação anti-inflamatória destes.

A maioria dos resultados com extrato glicólico de chá verde apresentou uma resposta dose dependente. Tanto no tempo de 5 min como no tempo de 24 h, houve redução dose dependente da produção de TNF- α e IL-1 β . A concentração de 12,5 mg/mL apresentou maior supressão de TNF- α e IL-1 β que a concentração de 3,13 mg/mL do extrato. Estes resultados estão de acordo com Chen et al. (2015) que também observaram que quanto maior foi a dose administrada de EGCG em ratos com mastite, maior foi a supressão de TNF- α e IL-1 β .

Um estudo *in vitro* de Marinovic et al. (2015) também verificou uma redução de TNF- α e IL-1 β em neutrófilos humanos estimulados com LPS e expostos tanto a uma mistura de catequinas (EGCG, EGC, ECG e EC) do chá verde quanto a uma delas isoladamente. Um estudo *in vivo* de Ramadan et al. (2015) apresentou

resultado semelhante com extrato aquoso de chá verde administrado via oral em ratos com artrite reumatoide .

No tempo de 24 h, a concentração de 12,5 mg/mL do extrato de chá verde reduziu os níveis de IL-1 β a valores semelhantes ao grupo controle, mas na concentração de 3,13 mg/mL a produção de IL-1 β aumentou. Assim, observa-se que a dose pode modular a produção de IL-1 β .

Outros estudos utilizando a mesma metodologia foram realizados por Martinez-Elizalde et al. (2015) que verificaram a ação anti-inflamatória do extrato metanólico do fruto da *Cyrtocarpa procedera* e por Tan et al. (2015) que obteve resultado semelhante como extrato hidroetanólico das flores de *M. oleífera* com redução de TNF- α e IL-1 β .

Assim, os estudos citados acima concordam com os resultados obtidos com chá verde na concentração de 12,5 mg/mL, sugerindo ação anti-inflamatória.

O extrato glicólico de aroeira-do-sertão em contato com as células estimuladas com LPS apresentou uma resposta dose dependente com aumento da produção de citocinas pró-inflamatórias. No tempo de exposição de 24 h, a concentração do 12,5 mg/mL induziu o dobro da produção de TNF- α e IL-1 β que a concentração de 3,13 mg/mL do extrato.

A maioria dos resultados com aroeira-do-sertão indicam aumento da produção das citocinas pró-inflamatórias, estes resultados foram parecidos com a ação imunopotenciadora dos polissacarídeos das raízes da *Sanguisorba officinalis*, pesquisados por Tong et al. (2015). As pesquisas sobre aroeira-do- sertão ainda são escassas e os resultados inovadores devem ser ampliados, a fim de direcionar seu uso terapêutico.

No tempo de 5 min, as células que foram estimuladas com extrato de alcachofra e LPS induziram um aumento na produção de TNF- α em relação ao grupo LPS. Embora, no tempo de 24 h a liberação de TNF- α apresentou valores semelhantes entre o grupo LPS e o grupo

LPS mais extrato. Com relação a liberação de IL-1 β , o grupo com extrato e LPS foi semelhante ao controle no tempo de exposição de 5 min. Não foi observado, no tempo de 24 h, redução de IL-1 β no grupo com extrato e LPS.

Embora muitos estudos tenham observado a ação anti-inflamatória da alcachofra (Zapolska-Downar et al., 2002; Yasukawa et al., 2010; Gurel et al., 2013; Tanaka et al., 2013). a maioria dos resultados com alcachofra não apresentou redução de TNF- α e de IL-1 β .

No presente estudo, as células que receberam os extratos na concentração de 3,13 mg/mL com LPS induziram a produção de IL-10 significativamente maior que a do grupo controle, demonstrando estimulação dos macrófagos.

No tempo de exposição de 5 min, todas as células que receberam os extratos vegetais com LPS apresentaram a produção de IL-10 maior em relação ao grupo de células que recebeu apenas LPS sugerindo uma maior regulação da resposta inflamatória. Este resultado está de acordo com a diminuição da produção de IL-1 β dos extratos na mesma concentração de 3,13 mg/mL.

No tempo de exposição de 24 h, os grupos que foram estimulados com extratos vegetais e LPS produziram 3 vezes menos IL-10 em relação ao grupo LPS, este resultado está de acordo com a liberação acentuada de IL-1 β dos extratos na mesma concentração de 3,13 mg/mL. Sendo assim, estes grupos não apresentaram de modo acentuado a ação regulatória da IL-10.

Portanto, as células expostas aos extratos vegetais e LPS foram capazes de inibir ou induzir a produção de citocinas pró-inflamatórias como IL-1 β e TNF- α e anti-inflamatória como IL-10. Somente o extrato glicólico de chá verde apresentou potencial anti-inflamatório na concentração de 12,5 mg/mL. Tais resultados indicam uma provável atuação imunomoduladora o que demanda por mais pesquisas.

Pode-se deduzir que os extratos glicólicos vegetais apresentam propriedades interessantes para uso odontológico, e que seria importante ampliar as pesquisas de seus efeitos anti-inflamatórios visando seu uso em dentifrícios, enxaguatórios bucais e medicamentos para conter o desenvolvimento do processo inflamatório..

O presente trabalho trata de um estudo *in vitro* com somente uma linhagem celular, uma vez que recebeu uma estimulação prévia com LPS, ou seja, semelhante a uma infecção microbiana, porém diferente das condições clínicas, nas quais existe a participação de várias células, especialmente dos linfócitos T, além da presença simultânea de outros estímulos, caracterizando um quadro extremamente mais complexo.

7 CONCLUSÃO

Com base nos resultados obtidos, foi possível concluir que:

A citotoxicidade dos extratos foi dose e tempo dependentes. No tempo de exposição de 5 min, o extrato de alcachofra apresentou citotoxicidade na concentração de 200 mg/mL. No tempo de exposição de 24 h, o chá verde apresentou citotoxicidade nas concentrações ≥ 50 mg/mL, aroeira-do-sertão estimulou a proliferação de macrófagos nas concentrações de 0,39 mg/mL a 12,5 mg/mL e a alcachofra apresentou citotoxicidade nas concentrações $\geq 12,5$ mg/mL. O extrato de chá verde apresentou potencial anti-inflamatório na concentração de 12,5 mg/mL, promovendo redução de IL-1 β e TNF- α . A aroeira-do-sertão apresentou ação imunopotenciadora na concentração de 12,5 mg/mL no tempo de exposição de 24 h, com aumento de IL-1 β e TNF- α . Com relação a alcachofra há necessidade de novos estudos para identificar sua ação imunomoduladora.

8 REFERÊNCIAS*

Antunes DP, Salvia AC, de Araújo RM, Di Nicoló R, Koga Ito CY, de Araújo MA. Effect of green tea extract and mouthwash without alcohol on *Candida albicans* biofilm on acrylic resin. *Gerodontology*. 2014 May 21. doi: 10.1111/ger.12132.

Brasil. Ministério da Saúde. Resolução RDC nº 267 de 22 de setembro de 2005. Aprova o “Regulamento técnico de espécies vegetais para o preparo de chás” [Internet]. Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). [acesso em 23 de Julho de 2015]. Disponível em: http://portal.anvisa.gov.br/wps/wcm/connect/e2ad670047457e3d8a4ade3fbc4c6735/RDC_267_2005.pdf?MOD=AJPERES

Brasil. Ministério da Saúde. Resolução RDC nº 26 de 13 de maio de 2014. Dispõe sobre o registro de medicamentos fitoterápicos e o registro e a notificação de produtos tradicionais fitoterápicos [Internet]. Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). [acesso em 23 de Julho de 2015]. Disponível em: http://portal.anvisa.gov.br/wps/wcm/connect/a9e43d0044140f579b5affb9cd167b7c/rdc0026_13_05_2014.pdf?MOD=AJPERES

Brasil. Ministério da Saúde. Bulas padrão de medicamentos fitoterápicos. [Internet]. Brasília (DF): Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA); 2011. [acesso em 23 de Julho de 2015]. Disponível em: http://www.anvisa.gov.br/medicamentos/fitoterapicos/bula_padronizadas_fitoterapico.pdf

Brasil. Ministério da Saúde. Formulário de Fitoterápicos Farmacopéia Brasileira. [Internet]. Brasília (DF): Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). [acesso em 23 de Julho de 2015]. Disponível em: http://www.anvisa.gov.br/hotsite/farmacopeiabrasileira/conteudo/Formulario_de_Fitoterapicos_da_Farmacopeia_Brasileira.pdf

*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

Brasil. Ministério da Saúde. Lista de Plantas medicinais de interesse para o SUS (RENISUS) de 6 de março de 2009. [Internet]. Brasília (DF): Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). [acesso em 23 de Julho de 2015] Disponível em: http://bvsms.saude.gov.br/bvc/sus/pdf/marco/ms_relacao_plantas_medicinais_sus_0603.pdf

Carlini EA, Duarte-Almeida JM, Tabach R. Assessment of the toxicity of the Brazilian pepper trees *Schinus terebinthifolius* Raddi (Aroeira-da-praia) and *Myracrodruon urundeuva* Allemão (Aroeira-do-sertão). *Phytother Res.* 2013;27(5):692-8. doi: 10.1002/ptr.4767. Epub 2012 Jul 4.

Carvalho Nilo Bitu V, Matias EF, de Lima WP, da Costa Portelo A, Coutinho HD, de Menezes IR. Ethnopharmacological study of plants sold for therapeutic purposes in public markets in Northeast Brazil. *J Ethnopharmacol.* 2015;172:265-72. doi: 10.1016/j.jep.2015.06.022. Epub 2015 Jun 20.

Chen J, Xu J, Li J, Du L, Chen T, Liu P, et al. Epigallocatechin-3-gallate attenuates lipopolysaccharide-induced mastitis in rats via suppressing MAPK mediated inflammatory responses and oxidative stress. *Int Immunopharmacol.* 2015;26(1):147-52. doi: 10.1016/j.intimp.2015.03.025

Choi YS, Bae CH, Song SY, Kim YD. The effect of Epigallocatechin-3-gallate in allergic airway inflammation. *Rhinology.* 2014;52(4):406-12. doi: 10.4193/Rhin13.189.

Cyboran S, Strugała P, Włoch A, Oszmiański J, Kleszczyńska H. Concentrated green tea supplement: biological activity and molecular mechanisms. *Life Sci.* 2015;126:1-9. doi: 10.1016/j.lfs.2014.12.025

Durazzo A, Foddai MS, Temperini A, Azzini E, Venneria E, Lucarini M, et al. Antioxidant properties of seeds from lines of artichoke, cultivated cardoon and wild cardoon. *Antioxidants (Basel).* 2013;2(2):52-61. doi: 10.3390/antiox2020052.

Estevão LR, Medeiros JP, Simões RS, Arantes RM, Rachid MA, Silva RM, et al. Mast cell concentration and skin wound contraction in rats treated with Brazilian pepper essential oil (*Schinus terebinthifolius* Raddi). *Acta Cir Bras.* 2015;30(4):289-95. doi: 10.1590/S0102-865020150040000008

Estevão LR, Mendonça FS, Baratella-Evêncio L, Simões RS, Barros ME, Arantes RM, et al. Effects of aroeira-do-sertão (*Schinus terebinthifolius* Raddi) oil on cutaneous wound healing in rats. *Acta Cir Bras*. 2013;28(3):202-9. <http://dx.doi.org/10.1590/S0102-86502013000300008>

Estève D, Galitzky J, Bouloumié A, Fonta C, Buchet R, Magne D. Multiple functions of MSCA-1/TNAP in adult mesenchymal progenitor/stromal cells. *Stem Cells Int*. 2016;2016:1815982. doi: 10.1155/2016/1815982

Figueredo FG, Lucena BF, Tintino SR, Matias EF, Leite NF, Andrade JC, et al. Chemical composition and evaluation of modulatory of the antibiotic activity from extract and essential oil of *Myracrodruon urundeuva*. *Pharm Biol*. 2014;52(5):560-5. doi: 10.3109/13880209.2013.853810.

Fissore EN, Santo Domingo C, Pujol CA, Damonte EB, Rojas AM, Gerschenson LN. Upgrading of residues of bracts, stems and hearts of *Cynara cardunculus* L. var. *scolymus* to functional fractions enriched in soluble fiber. *Food Funct*. 2014;5(3):463-70. doi: 10.1039/c3fo60561b.

Guerra MP, Nodari RO. Biodiversidade: aspectos biológicos, geográficos, legais e éticos. In: Simões CMO, Schenkel EP, Gosmann G, Mello JCP, Mentz LA, Petrovick PR. *Farmacognosia da planta ao medicamento*. Florianópolis: Ed. Universidade/UFRGS/ Ed. Da UFSC; 2000. Cap. 1. p. 11-24.

Gurel E, Ustunova S, Ergin B, Tan N, Caner M, Tortum O, et al. Herbal haemorrhoidal cream for haemorrhoids. *Chin J Physiol*. 2013;56(5):253-62. doi: 10.4077/CJP.2013.BAB127

Hong JM, Kwon OK, Shin IS, Song HH, Shin NR, Jeon CM, et al. Anti-inflammatory activities of *Physalis alkekengi* var. *franchetii* extract through the inhibition of MMP-9 and AP-1 activation. *Immunobiology*. 2015;220(1):1-9. doi:10.1016/j.imbio.2014.10.004

Hrishi T, Kundapur P, Naha A, Thomas B, Kamath S, Bhat G. Effect of adjunctive use of green tea dentifrice in periodontitis patients: a randomized controlled pilot study. *Int J Dent Hyg*. 2015. doi: 10.1111/idh.12131. [Epub ahead of print]

Jesus D, Oliveira JR, Oliveira FE, Higa KC, Junqueira JC, Jorge AOC, et al. *Persea americana* glycolic extract: In vitro study of antimicrobial activity against *Candida albicans* biofilm and cytotoxicity evaluation. *The Scientific World Journal*. 2015;Nov 5 doi:10.1155/2015/531972. [Epub ahead of print]

Jorjão AL. Avaliação dos efeitos de *Lactobacillus rhamnosus* e seus produtos sobre a produção de mediadores pró e anti-inflamatórios por macrófagos [dissertação]. São José dos Campos (SP): Faculdade de Odontologia de São José dos Campos, UNESP - Univ Estadual Paulista; 2012.

Lessmann H, Schnuch A, Geier J, Uter W. Skin-sensitizing and irritant properties of propyleneglycol. *Contact Dermatitis*. 2015;53:247–59. Doi: 10.1111/j.0105-1873.2005.00693.x

Machado AC, Oliveira RC. Medicamentos Fitoterápicos na odontologia : evidências e perspectivas sobre o uso da aroeira-do-sertão (*Myracrodruon urundeuva* Allemão). *Rev. Bras. Plantas Med.* 2014;16:283–9.

Marinovic MP, Morandi AC, Otton R. Green tea catechins alone or in combination alter functional parameters of human neutrophils via suppressing the activation of TLR-4/NFκβ p65 signal pathway. *Toxicology in Vitro*. 2015;29:1766–78. doi: 10.1016/j.tiv.2015.07.014.

Martinez-Elizalde KS, Jimenez-Estrada M, Flores CM, Hernandez LB, Rosas-Lopez R, Duran-Diaz A, et al. Evaluation of the medicinal properties of *Cyrtocarpa procera* Kunth fruit extracts. *BMC Complement Altern Med*. 2015;15:74. doi: 10.1186/s12906-015-0602-y.

Mota MA, Landim JS, Targino TS, Silva SF, Silva SL, Pereira MR. Evaluation of the anti-inflammatory and analgesic effects of green tea (*Camellia sinensis*) in mice. *Acta Cir Bras*. 2015;30(4):242-6. doi: 10.1590/S0102-865020150040000002.

Nootash S, Sheikhzadeh N, Baradaran B, Oushani AK, Maleki Moghadam MR, Nofouzi K, et al. Green tea (*Camellia sinensis*) administration induces expression of immune relevant genes and biochemical parameters in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Fish Shellfish Immunol*. 2013;35(6):1916-23. doi: 10.1016/j.fsi.2013.09.030.

Oliveira FE. Atividade imunomoduladora de *Lactobacillus rhamnosus* em macrófagos de camundongos estimulados com Lipopolisacarídeo, Ácido Lipoteicóico e manana [dissertação]. São José dos Campos (SP): Instituto de Ciência e Tecnologia, UNESP – Univ Estadual Paulista; 2013.

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

Oliveira JR, de Castro VC, das Graças Figueiredo Vilela P, Camargo SE, Carvalho CA, Jorge AO, et al. Cytotoxicity of Brazilian plant extracts against oral microorganisms of interest to dentistry. *BMC Complement Altern Med*. 2013;13:208. doi: 10.1186/1472-6882-13-208.

Oliveira JR, de Aguiar Almeida RB, das Graças Figueiredo Vilela P, de Oliveira FE, da Rocha RF, Jorge AO, et al. Control of microorganisms of oral health interest with *Arctium lappa* L. (burdock) extract non-cytotoxic to cell culture of macrophages (RAW 264.7). *Arch Oral Biol*. 2014;59(8):808-14. doi: 10.1016/j.archoralbio.2014.05.013.

Oliveira LD, Carvalho CA, Carvalho AS, Alves Jde S, Valera MC, Jorge AOC. Efficacy of endodontic treatment for endotoxin reduction in primarily infected root canals and evaluation of cytotoxic effects. *J Endod*. 2012;38(8):1053–7. doi: 10.1016/j.joen.2012.04.015.

Radji M, Agustama RA, Elya B, Tjampakasari CR. Antimicrobial activity of green tea extract against isolates of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* and multi-drug resistant *Pseudomonas aeruginosa*. *Asian Pac J Trop Biomed*. 2013;3(8):663-7. doi: 10.1016/S2221-1691(13)60133-1.

Ramadan G, El-Beih NM, Talaat RM, Abd El-Ghffar EA. Anti-inflammatory activity of green versus black tea aqueous extract in a rat model of human rheumatoid arthritis. *Int J Rheum Dis*. 2015 May 12. doi: 10.1111/1756-185X.12666. [Epub ahead of print]

Reis SR, Sadigursky M, Andrade MG, Soares LP, Espirito Santo AR, Vilas Boas DS. Genotoxic effect of ethanol on oral mucosa cells. *Pesqui Odontol Bras*. 2002;16(3):221-5. <http://dx.doi.org/10.1590/S1517-74912002000300007>

Ribas MO, Sousa MH, Sartoretto J, Lanzoni TA, Noronha L, Acra LA. Effect of the *Schinus terebinthifolius* Raddi in the process of tissular repair in ulcers induced in mucosa oral of the rat. *J Dent Science*. 2006; 21:245–252.

Rowe RC, Sheskey PJ, Weller PJ. *Handbook of pharmaceutical excipients*. 4. ed. Great Britain: Pharmaceutical Press; 2003.

Saraiva ME, Ulisses AV, Ribeiro DA, de Oliveira LG, de Macêdo DG, de Sousa FF, et al. Plant species as a therapeutic resource in areas of the savanna in the state of Pernambuco, Northeast Brazil. *J Ethnopharmacol*. 2015;171:141-53. doi: 10.1016/j.jep.2015.05.034.

Tan WS, Arulselvan P, Karthivashan G, Fakurazi S. *Moringa oleifera* flower extract suppresses the activation of inflammatory mediators in lipopolysaccharide-stimulated RAW 264.7 macrophages via NF- κ B pathway. *Mediators Inflamm.* 2015;2015:720171. doi: 10.1155/2015/720171.

Tanaka YT, Tanaka K, Kojima H, Hamada T, Masutani T, Tsuboi M, et al. Cynaropicrin from *Cynara scolymus* L. suppresses photoaging of skin by inhibiting the transcription activity of nuclear factor-kappa B. *Bioorg Med Chem Lett.* 2013;23(2):518-23. doi: 10.1016/j.bmcl.2012.11.034.

Tong H, Mao D, Zhai M, Zhang Z, Sun G, Jiang G. Macrophage activation induced by the polysaccharides isolated from the roots of *Sanguisorba officinalis*. *Pharm Biol.* 2015;53(10):1511-5. doi: 10.3109/13880209.2014.991834.

Tropicos. *Cynara cardunculus* var. *scolymus* (L.) Fiori [Internet]. St. Louis: Missouri Botanical Garden; 2016. [acesso 26 Jan 2016]. Disponível em: <http://www.tropicos.org/Name/50282151>

Yasukawa K, Matsubara H, Sano Y. Inhibitory effect of the flowers of artichoke (*Cynara cardunculus*) on TPA-induced inflammation and tumor promotion in two-stage carcinogenesis in mouse skin. *J Nat Med.* 2010;64(3):388-91. doi: 10.1007/s11418-010-0403-z.

Zapolska-Downar D, Zapolski-Downar A, Naruszewicz M, Siennicka A, Krasnodebska B, Kołodziej B. Protective properties of artichoke (*Cynara scolymus*) against oxidative stress induced in cultured endothelial cells and monocytes. *Life Sci.* 2002;71(24):2897-908. Doi:10.1016/S0024-3205(02)02136-7

Zhao L, La VD, Grenier D. Antibacterial, antiadherence, antiprotease, and anti-inflammatory activities of various tea extracts: potential benefits for periodontal diseases. *J Med Food.* 2013;16(5):428-36. doi: 10.1089/jmf.2012.0207.

Zhu X, Zhang H, Lo R. Phenolic compounds from the leaf extract of artichoke (*Cynara scolymus* L.) and their antimicrobial activities. *J Agric Food Chem.* 2004;52(24):7272-8. Doi: 10.1021/jf0490192

Zhu XF, Zhang HX, Lo R. Antifungal activity of *Cynara scolymus* L. extracts. *Fitoterapia.* 2005;76(1):108-11. doi:10.1016/j.fitote.2004.10.016