

RESSALVA

Atendendo solicitação do(a) autor(a), o texto completo desta dissertação será disponibilizado somente a partir de 09/07/2017.



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

LÍGIA NISHIAMA THEODORO

**ANÁLISE DA BIOCOMPATIBILIDADE E AÇÃO
ANTIMICROBIANA DA MATRIZ DE HIDROGEL
ASSOCIADA AO EXTRATO DE *Stryphnodendron barbatiman***

2017

LÍGIA NISHIAMA THEODORO

**ANÁLISE DA BIOCOMPATIBILIDADE E AÇÃO ANTIMICROBIANA
DA MATRIZ DE HIDROGEL ASSOCIADA AO EXTRATO DE
*Stryphnodendron barbatiman***

Dissertação apresentada ao Instituto de Ciência e Tecnologia, Universidade Estadual Paulista (Unesp), Campus de São José dos Campos, como parte dos requisitos para obtenção do título de MESTRE, pelo Programa de Pós-Graduação em BIOPATOLOGIA BUCAL, Área de Microbiologia/Imunologia.

Orientadora: Profa. Adj. Samira Esteves Afonso Camargo

São José dos Campos

2017

Instituto de Ciência e Tecnologia [internet]. Normalização de tese e dissertação [acesso em 2016]. Disponível em <http://www.ict.unesp.br/biblioteca/normalizacao>

Apresentação gráfica e normalização de acordo com as normas estabelecidas pelo Serviço de Normalização de Documentos da Seção Técnica de Referência e Atendimento ao Usuário e Documentação (STRAUD).

Theodoro, Lígia Nishiana

Análise da biocompatibilidade e ação antimicrobiana da matriz de hidrogel associada ao extrato de *Stryphnodendron barbatiman* / Lígia Nishiana Theodoro.
- São José dos Campos : [s.n.], 2017.
45 f. : il.

Dissertação (Mestrado em Biopatologia Bucal) - Pós-graduação em Biopatologia Bucal - Universidade Estadual Paulista (Unesp), Instituto de Ciência e Tecnologia, São José dos Campos, 2017.

Orientadora: Samira Esteves Afonso Camargo.

1. Biomateriais. 2. Biocompatibilidade. 3. Antimicrobiana. I. Camargo, Samira Esteves Afonso, orient. II. Universidade Estadual Paulista (Unesp), Instituto de Ciência e Tecnologia, São José dos Campos. III. Universidade Estadual Paulista 'Júlio de Mesquita Filho' - Unesp. IV. Universidade Estadual Paulista (Unesp). V. Título.

BANCA EXAMINADORA

Profa. Adj. Samira Esteves Afonso Camargo (Orientadora)

Universidade Estadual Paulista (Unesp)

Instituto de Ciência e Tecnologia

Campus de São José dos Campos

Profa. Dra. Kátia de Araújo Prado Ferreira Leite

Universidade Paulista (UNIP)

Campus de São José dos Campos

Profa. Dra. Mirian Marcolan de Mello

Universidade Paulista (UNIP)

Campus de São José dos Campos

São José dos Campos, 09 de janeiro de 2017.

DEDICATÓRIA

Ao meu Senhor e meu Deus, toda honra e toda glória para Ti.

Aos meus amados pais, por toda cumplicidade e dedicação.

À minha irmã gêmea, pela união e companheirismo.

Ao meu esposo, grande amor da minha vida.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus por me presentear com inúmeras graças em minha vida, inclusive esta linda oportunidade de aprendizado. Que a sabedoria divina me ilumine e me capacite para honrar e retribuir todas as bênçãos em minha vida.

Aos que são a razão do meu viver, agradeço profundamente minha família pelo amor que é fonte de motivação para alcançar meus objetivos. Em especial, meu esposo Bruno Vilela de Souza, muito obrigada pelo seu apoio, amor e carinho, que nossa sinergia continue sendo fonte de alegria, amor, força, determinação e perseverança. Aos meus pais, Vicente de Paulo Theodoro e Kayomi Nishiyama Theodoro, que são meus melhores exemplos, agradeço imensamente pela dedicação na realização dos meus sonhos e a minha querida irmã Livia Nishiyama Theodoro agradeço pela nossa amizade, cumplicidade, apoio e carinho.

Ao curso de Biopatologia Bucal, muito obrigada por esta oportunidade que proporcionou esta experiência incrível.

Aos colegas e os funcionários que convivi ao longo dessa jornada, agradeço pela companhia e contribuição.

Agradeço imensamente a professora Samira pela orientação, paciência e compreensão que contribuíram grandemente para minha formação acadêmica e para a conclusão deste trabalho.

A todos professores que foram essenciais na minha formação acadêmica.

Muito obrigada!

“O Altíssimo deu-lhes a ciência da medicina para ser honrado em suas maravilhas e dela se serve para acalmar as dores e curá-las, o farmacêutico faz misturas agradáveis e seu trabalho não terminará, até que a paz divina se estenda sobre a face da terra.” Eclesiástico, 38:6-8

SUMÁRIO

RESUMO	07
ABSTRACT	08
1 INTRODUÇÃO	09
2 PROPOSIÇÃO	17
3 MATERIAL E MÉTODOS	18
3.1 Grupos experimentais	18
3.2 Plaqueamento <i>HydroMatrix Peptide Cell Culture Scaffold</i> ...	18
3.3 Análises de Ação Antimicrobiana	20
3.3.1 Determinação da CIM e CMM do extrato <i>S. barbatiman</i> ..	21
3.3.2 Atividade antimicrobiana em biofilme de <i>E. faecalis</i>	22
3.4 Análises de Biocompatibilidade	24
3.4.1 Cultura celular de macrófagos (RAW 264.7)	24
3.4.2 Citotoxicidade – Ensaio de MTT	27
3.4.3 Genotoxicidade – Ensaio de Micronúcleo.....	28
4 RESULTADOS	29
4.1 CIM e CMM do extrato do <i>S. barbatiman</i>	29
4.2 Ação antimicrobiana em biofilme <i>E. faecalis</i>	32
4.3 Citotoxicidade – Ensaio de MTT	33
4.4 Ensaio de genotoxicidade.....	35
5 DISCUSSÃO.....	36
6 CONCLUSÃO.....	40
REFERÊNCIAS.....	41

Theodoro L.N. Análise da biocompatibilidade e ação antimicrobiana da matriz de hidrogel associado ao extrato de *Stryphnodendron barbatiman* [dissertação]. São José dos Campos (SP): Universidade Estadual Paulista (Unesp), Instituto de Ciência e Tecnologia; 2017.

RESUMO

A matriz hidrogel é um biomaterial que mimetiza a matriz extracelular natural auxiliando na proliferação celular para a regeneração tecidual. A proposta deste estudo foi avaliar a biocompatibilidade e atividade antimicrobiana da matriz hidrogel associado ao extrato de *Stryphnodendron barbatiman* comparado ao antibiótico ciprofloxacino. Para as análises microbiológicas, foram realizados os testes sobre a cepa *Enterococcus faecalis* (ATCC 4083) em suspensão planctônica, por meio do ensaio de microdiluição e em biofilme pelo teste de MTT. Para os ensaios de biocompatibilidade foram utilizados macrófagos RAW 264.7 para verificar a citotoxicidade pelo ensaio de viabilidade celular MTT e a genotoxicidade pelo teste de micronúcleos. A análise estatística foi realizada pelo teste ANOVA e *Tukey*, adotando o nível de significância 5%. Os resultados demonstraram que a matriz de hidrogel associado ao barbatimão apresentou atividade antimicrobiana em planctônico somente na concentração 12,5 mg/mL. No entanto, não apresentou ação antimicrobiana em biofilme monotípico de *E. faecalis*. A matriz de hidrogel associado ao barbatimão não foi citotóxico, promovendo alta proliferação celular e não apresentou genotoxicidade para macrófagos. O antibiótico ciprofloxacino apresentou efetiva atividade antimicrobiana sobre *E. faecalis*, mas por outro lado foi citotóxico e genotóxico para macrófagos. Conclui-se que o extrato de *Stryphnodendron barbatiman* associado ou não a matriz de hidrogel apresentou pequena atividade antimicrobiana sobre *E. faecalis*, mas não foi citotóxico nem genotóxico para macrófagos.

Palavras-chave: Biocompatibilidade. Antimicrobiano. *Enterococcus faecalis*. Matriz hidrogel. *Stryphnodendron barbatiman*.

Theodoro LN. Analysis of the biocompatibility and antimicrobial action of the hydrogel matrix associated with Stryphnodendron barbatiman extract [dissertation]. São José dos Campos (SP): São Paulo State University, Institute of Science and Technology; 2017.

ABSTRACT

The hydrogel matrix can be useful for many applications in medical devices, this promissor biomaterial mimics the natural extracellular matrix and is able to enhance cell proliferation and tissue regeneration, also can control release of drugs. The purpose of this study was to evaluate the biocompatibility and antimicrobial activity of the hydrogel matrix associated with a natural extract from Brazil Stryphnodendron barbatiman compared to the ciprofloxacin. For the analysis of antimicrobial activity, the tests were performed on Enterococcus faecalis (ATCC 4083) in the planktonic suspension by the microdilution assay and biofilm by MTT assay. For biocompatibility assays macrophages RAW 264.7 were used to evaluate the cytotoxicity by cell viability assay (MTT) and genotoxicity by micronucleus test. Statistical analysis was performed by ANOVA and Tukey test, adopting a significance level of 5%. The results showed that the hydrogel matrix associated with S. barbatiman showed antimicrobial activity on planktonic only the concentration 12.5 mg/mL. However, showed no antimicrobial action in monotypic biofilms of E. faecalis. The hydrogel matrix associated with S. barbatiman was not cytotoxic, promoting high proliferation cell and was not genotoxic for macrophages. The antibiotic ciprofloxacin showed effective antimicrobial activity against E. faecalis, but was cytotoxic and genotoxic to macrophages. We conclude that the S. barbatiman extract with or without the hydrogel matrix showed little antimicrobial activity against E. faecalis, but it was not cytotoxic or genotoxic to macrophages.

Keywords: Biocompatibility. Antimicrobial. Enterococcus faecalis. Hydrogel matrix. Stryphnodendron barbatiman.

1 INTRODUÇÃO

A busca de novos e mais eficientes biomateriais para transposição clínica é um grande desafio para comunidade científica e imprescindível na área médica e odontológica visto que os avanços contínuos impactam na melhoria da qualidade de vida de muitos pacientes.

A Engenharia tecidual é uma ciência multidisciplinar que desenvolve maneiras de restaurar, manter ou aumentar as funções biológicas de diversos tecidos. Dentro disso, o desenvolvimento de nanofibras está sendo realizado para a regeneração de tecidos moles, ossos e cartilagem, hemostasia, sistema de liberação controlada de drogas, entre outras. Estes biomateriais denominados *scaffolds* ou matrizes possuem estrutura física tridimensional que mimetizam a matriz extracelular natural, exercendo função de suporte físico para as células, acelerando a proliferação celular e a regeneração tecidual, colaborando para reconstituição de diversos tecidos (Barbanti et al., 2005; Popat, 2011; Costa RG et al., 2012).

Na odontologia, muitos dos procedimentos realizados visam a substituição de tecidos ou elementos dentários perdidos, recorrendo à utilização de biomateriais sintéticos na tentativa da substituição destes tecidos danificados porém esses materiais podem apresentar algumas características negativas e em conjunto com o ambiente hostil da cavidade oral, podem ter sua vida relativamente curta e frequente necessidade de retratamento. Desta maneira, a área de engenharia tecidual representa para a odontologia contemporânea perspectivas para o desenvolvimento de novas estratégias e de metodologias mais eficientes para os pacientes da clínica, pois visam a regeneração do tecido ao invés da sua substituição (Rosa et al., 2012).

Na endodontia regenerativa grandes desafios são encontrados com relação às infecções endodônticas secundárias. A infecção da polpa dentária ocorre pelo ingresso de micro-organismos presentes na cavidade bucal, por meio do comprometimento da integridade dental devido a fraturas, acidentes no preparo cavitário, cáries profundas, entre outros. A invasão, instalação e multiplicação microbiológica no tecido pulpar leva a infecção, acarretando danos neste tecido que podem levar a necrose pulpar em casos avançados. Há uma grande variedade de micro-organismos da cavidade bucal capaz de colonizar o tecido pulpar, porém o perfil microbiológico nas infecções primárias ou não tratadas, demonstram que este tecido é um local favorável ao desenvolvimento de infecção polimicrobiana, diferentemente do que ocorre nas infecções secundárias, que persistem ao tratamento endodôntico e apresentam micro-organismos mais específicos. Dentre os micro-organismos existentes em infecções pulpares, *Enterococcus faecalis*, tem sido destacado principalmente pela sua alta prevalência, de até 90% dos casos, nas infecções pulpares secundárias, pois conseguem sobreviver e colonizar o canal radicular após o um procedimento mal sucedido (Dahlén et al., 2012; Endo et al., 2013; Jorge, 2012).

E. faecalis são cocos gram-positivos dispostos em pares ou cadeias, anaeróbios facultativos, catalase negativa, não formadores de esporos e seus principais fatores de virulência são a produção de ácido lipoteicóico, gelatinase, hialuronidase, citolisina, substâncias de agregação, feromonas e proteínas de choque térmico (Jorge, 2006). Outro fator muito importante sobre *E. faecalis* é sua resistência aos antibióticos, uma vez que podem produzir beta-lactamases e outros mecanismos de resistência contra a vancomicina e a cefalosporina, além de outras substâncias como hipoclorito de sódio e hidróxido de cálcio que são frequentemente utilizadas durante o tratamento endodôntico. Assim, as dificuldades em obter sucesso no tratamento das infecções pulpares secundárias resistentes, motivam o estudo de novas metodologias para estes casos (Ferrari,

Bombana, 2010).

A existência de células multipotentes altamente proliferativas presentes na polpa dentária, despertam novas possibilidades e expectativas promissoras na contemporânea engenharia tecidual endodôntica. Estudos demonstram que são necessários para dar início ao processo de diferenciação, as próprias células-tronco originadas da polpa dentária, uma matriz extracelular e fatores de crescimento. A associação das células-tronco da polpa com uma matriz estrutural promove o suporte físico que propicia a proliferação celular e a aplicação de substâncias sinalizadoras fornece o estímulo necessário para diferenciação celular. Este exposto abre um caminho com inúmeras possibilidades para diversos estudos, com o objetivo da regeneração do complexo dentino pulpar (Janjić et al., 2016; Cordeiro et al., 2008; Leal 2007; Soares AP et al., 2007).

Na literatura, o uso de *scaffolds* ou matrizes está em ascensão, uma vez que estes apresentam características capazes de promover a proliferação celular, além da possibilidade de controlar a liberação de substâncias antibióticas que possibilitam o controle de infecções. Há relatos bem-sucedidos de estudos *in vitro* que incorporaram substâncias antibióticas nestes *scaffolds*, demonstrando a ação de liberação controlada de antibióticos. Porém, ainda existe poucos estudos com relação aos mecanismos de eficácia e segurança desse tratamento (Drury, Mooney, 2003; Feng et al., 2010; Ruckh et al., 2012).

Feng et al. (2010) desenvolveram uma matriz de nanofibra composta pelo antibiótico doxiciclina e avaliaram o perfil de liberação deste antibiótico por meio da espectrofotometria e verificaram sua atividade antimicrobiana. A concentração do antibiótico apresentou duas fases, uma alta liberação inicial durante o primeiro dia, seguido por uma liberação lenta ao longo de 42 dias. A ação antimicrobiana foi testada no *Staphylococcus aureus* e na *Escherichia coli*, inibindo o crescimento desses micro-organismos. A longa duração da liberação

do antibiótico significa um importante progresso para o tratamento de infecções dentárias. Ruckh et al. (2012) desenvolveram um *scaffold* incorporado ao antibiótico rifamicina nas concentrações 10% e 20% de antibiótico. Os *scaffolds* foram colocados em contato com os micro-organismos *Pseudomonas aeruginosa* e *Staphylococcus epidermidis*. O *scaffold* liberou o antibiótico rifamicina em duas etapas, inicialmente é liberado uma dose em alta concentração num período curto de 1 a 2 horas, e posteriormente a liberação foi lenta e prolongada por 8 horas. Assim, com este mecanismo de liberação local da droga, obteve-se sucesso na eliminação dos micro-organismos, além da vantagem de se obter uma concentração alta inicial, evitando concentrações sistêmicas potencialmente tóxicas.

Especificamente na Endodontia, Bottino et al. (2013) avaliaram a atividade antimicrobiana sobre *Porphyromonas gingivalis* e *E. faecalis* de *scaffolds* de nanofibras associados a duas concentrações (5 e 25% em peso) de ciprofloxacina e metronidazol. Também a citotoxicidade destes *scaffolds* foi avaliado em células-tronco da polpa. Verificou-se por meio de cromatografia líquida de alta eficiência, que o período de liberação dos antibióticos foi de 48 horas. Os *scaffolds* contendo ciprofloxacina foram capazes de inibir o crescimento de *E. faecalis* em biofilme. A concentração de 25% em peso da ciprofloxacina foi tóxica para as células. Os autores sugerem que o *scaffold* de nanofibras contendo antibiótico pode ser um sistema seguro de liberação de drogas para a regeneração endodôntica.

O desenvolvimento de novos métodos de controle de infecções é uma preocupação extremamente importante, principalmente diante do aumento de cepas bacterianas resistentes aos antibióticos convencionais. Portanto, é pertinente pesquisas relacionadas aos fitoterápicos para desenvolvimento de novas alternativas no combate de micro-organismos. No Brasil, a rica biodiversidade oferece grande variedade botânica e o uso de plantas medicinais

viabiliza para ciência indícios favoráveis com pesquisas que envolvem fitoterápicos. Com o intuito de inovar, propõe-se neste trabalho a utilização do *Stryphnodendron barbatiman*, uma substância fitoterápica farmacologicamente ativa para associá-la ao *scaffold* ou matriz de hidrogel com o objetivo de potencializar seu efeito reparador.

O *Stryphnodendron barbatiman* origina-se de uma planta nativa do cerrado brasileiro, conhecida também como barbatimão, barba-de-timão ou casca-da-virgindade que é amplamente utilizado no Brasil pelo conhecimento empírico popular por apresentar propriedades medicinais benéficas relacionadas as ações cicatrizante, adstringente, antibiótica, antifúngica, anti-inflamatória, anti-oxidante entre outras. A casca é a parte mais utilizada desta planta e sua composição química é a responsável pelas atividades biológicas desta planta que é composta principalmente por taninos condensados (protoantocianidinas) e outros constituintes químicos em menor quantidade (Ferreira et al., 2013; Monteiro et al., 2005; Nascimento et al., 2016; Passaretti et al., 2016; Chaves et al., 2016).

Com relação a atividade antimicrobiana do barbatimão é possível encontrar na literatura estudos bem-sucedidos da aplicação deste fitoterápico em diversos micro-organismos. No estudo de Oliveira et al. (2013) o *S. barbatiman* foi avaliado com relação a sua ação antimicrobiana em cepas clínicas e *American Type Culture Collection* (ATCC) de *Streptococcus mutans* e *Candida albicans* e a citotoxicidade e produção de citocinas em macrófagos. Verificou-se que o extrato de *S. barbatiman* apresentou uma ação antimicrobiana mais sensível ao *S. mutans* que para *C. albicans*, além de ter sido considerado não citotóxico. A suscetibilidade *in vitro* de micro-organismos patogênicos da cavidade oral (*S. mutans*, *S. aureus*, *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* e *C. albicans*) aos extratos aquosos e etanólicos do barbatimão foi avaliada por Santos et al. (2004), os resultados mostraram que os extratos etanólicos

apresentaram maior ação antimicrobiana em relação ao extrato aquoso, demonstrando que a solução extratora pode influenciar na extração qualitativa e quantitativa dos componentes do barbatimão com consequências na atividade biológica, neste trabalho os resultados mostraram que o barbatimão teve ação antimicrobiana em todos micro-organismos testados e concluíram que os extratos de barbatimão apresentam alta atividade antimicrobiana contra os micro-organismos patogênicos da cavidade oral.

Estudos *in vivo* foram realizados com o barbatimão com o intuito de avaliar a toxicidade via oral das concentrações de barbatimão 500, 1.000, 2.000, 3.000, 4.000, e 5.000 mg·kg⁻¹ em ratos Swiss e após 14 dias foram realizadas análises comportamentais e exames histológicos. Os resultados mostraram que as concentrações de barbatimão apresentaram baixa toxicidade o que pode-se sugerir que este possa ser administrado com grande nível de segurança (Costa MA et al., 2013). Ainda, Melo et al. (2007) avaliaram o efeito da diminuição de dor do barbatimão em modelos animais através de testes de contorção abdominal induzidos pelo ácido acético, injeção intraplantar de formalina e placa quente. O grupo tratado com o barbatimão demonstrou um efeito evidente na diminuição de dor quando comparado ao grupo controle.

Com relação as propriedades de regeneração celular, o barbatimão demonstrou em alguns estudos a capacidade de estimular o processo de cicatrização. Seus componentes proporcionam um efeito adstringente que são capazes de ligar às proteínas dos tecidos lesados, criando uma camada protetora que isola o local da ferida, reduzindo a permeabilidade e exsudação da ferida e promovendo a reparação dos tecidos, além de apresentarem propriedades antimicrobianas, vasoconstritoras e anti-inflamatórias que auxiliam na regeneração dos tecidos (Passaretti et al., 2016). Chaves et al. (2016), realizaram um estudo *in vivo*, utilizando como modelo experimental a membrana do ovo embrionado de galinha para avaliar a atividade angiogênica da solução aquosa

de barbatimão 30 mg/mL comparado ao conhecido indutor de angiogênese Regederm®. Os resultados demonstraram que a solução de barbatimão apresentou um percentual de vascularização de 50,4% e o controle indutor Regederm® de 52,9%, concluindo que a aplicação da solução aquosa de barbatimão pode ser benéfica em situações clínicas como na reparação e cicatrização de feridas que estão relacionadas aos estímulos angiogênicos. Ainda, Lima et al. (2016), avaliaram o creme de barbatimão 5% como adjuvante na reparação tecidual em lesões cutâneas de coelho. Foram induzidas quatro feridas cutâneas na região dorsal dos coelhos que foram submetidos ao tratamento com creme de barbatimão 5% e aos controles. As feridas foram analisadas por meio de exames clínicos diários durante 21 dias corridos e por análises histológicas. Os resultados demonstraram que o creme de barbatimão 5% auxiliou no processo de reparação da pele em coelhos quando comparado aos demais tratamentos, promovendo a proliferação de fibroblastos, o aumento da produção de colágeno, a reepitelização e a neovascularização. Concluindo que o creme de barbatimão 5% é eficiente e economicamente viável como adjuvante no processo de cicatrização de feridas cutâneas.

A associação do extrato de barbatimão a um biomaterial foi observado no estudo de Borges et al. (2015) em que avaliaram o comportamento de liberação do extrato hidroetanólico do barbatimão carregados por biomembranas de látex obtidos a partir de seringueira *Hevea* por espectroscopia de ultravioleta-visível. Os resultados demonstraram nas análises de espectroscopia de infravermelho em reflectância total atenuada que não houve interação química que pudessem alterar a estrutura molecular entre o carreador e o extrato de barbatimão e a partir da microscopia eletrônica de varredura foi possível observar o extrato na superfície da biomembrana de látex. O comportamento de liberação controlada ocorreu inicialmente com uma liberação rápida, seguida de uma liberação mais lenta do extrato de barbatimão com a liberação sustentada

por 7 dias, este estudo demonstra a possibilidade da associação de extratos fitoterápicos em biomateriais.

Diante do exposto, os grandes avanços da endodontia regenerativa indicam que benefícios terapêuticos estarão disponíveis em um futuro próximo. No desenvolvimento de novas tecnologias aplicadas a endodontia contemporânea é importante explorar alternativas para ampliar este campo em rápida ascensão na busca de melhores e mais eficazes associações entre as células, matriz extracelular e fatores de crescimento para o controle de infecção e regeneração da polpa dentária, afim de se estabelecer um protocolo seguro, eficaz e com ótimo custo-benefício. Desta forma, este estudo avaliou *in vitro* a matriz de hidrogel associado ao extrato *Stryphnodendron barbatiman* (barbatimão) comparando ao antibiótico ciprofloxacino, visando conhecer sua biocompatibilidade em células macrófagos e atividade antimicrobiana em cepas de *E. faecalis*.

6 CONCLUSÃO

Conclui-se que o extrato de barbatimão associado ou não a matriz de hidrogel apresentou uma baixa atividade antimicrobiana sobre *E. faecalis*. Em contrapartida, esta associação causou alta proliferação de macrófagos e não apresentou potencial genotóxico.

REFERÊNCIAS*

- Barbanti SH, Zavaglia CA, Duek EA. Polímeros bioreabsorvíveis na engenharia de tecidos. *Polímeros*. 2005;(15):5-19.
- Borges FA, Siguematsu PR, Herculano RD, Santos C. Novel sustained-release of *Stryphnodendron obovatum* leaves extract using natural rubber latex as carrier. *Rev Ciênc Farm Básica Apl*. 2015;36(3):379-84.
- Bottino MC, Kamocki K, Yassen GH, Platt JA, Vail MM, Ehrlich Y, et al. Bioactive nanofibrous scaffolds for regenerative endodontics. *J Dent Res*. 2013;92(11):963-9.
- Chaves DA, Lemes SR, Araujo LA, Sousa MA, Freitas GB, Lino-Junior RS, et al. Avaliação da atividade angiogênica da solução aquosa do barbatimão (*Stryphnodendron adstringens*). *Rev Bras Plantas Med*. 2016;18:524-30.
- Cordeiro MM, Dong Z, Kaneko T, Zhang Z, Miyazawa M, Shi S, et al. Dental pulp tissue engineering with stem cells from exfoliated deciduous teeth. *Int J Endod*. 2008;34(8):962-9.
- Costa RG, Oliveira JE, Paula GF, Picciani PH, Medeiros ES, Ribeiro C, et al. Eletrofiação de Polímeros em Solução. Parte I: Fundamentação Teórica. *Polímeros*. 2012;22(2):170-7.
- Costa MA, Ishida K, Kaplum V, Koslyk ED, Mello JC, Nakamura T, et al. Safety evaluation of proanthocyanidin polymer-rich fraction obtained from stem bark of *Stryphnodendron adstringens* (Barbatimão) for use as a pharmacological agent. *Regul Toxicol Pharmacol*. 2010;58:330-5.
- Costa MA, Mello JC, Kaneshima EN, Ueda-Nakamura T, Benedito Filho P, Audi EA, et al. Acute and Chronic Toxicity of an Aqueous Fraction of the Stem Bark of *Stryphnodendron adstringens* (Barbatimão) in Rodents. *Evid Based Complement Alternat Med*. 2013;1-9.

* Baseado em: International Committee of Medical Journal Editors Uniform Requirements for Manuscripts Submitted to Biomedical journals: Sample References [Internet]. Bethesda: US NLM; c2003 [atualizado 04 nov 2015; acesso em 25 jun 2016]. U.S. National Library of Medicine; [about 6 p.]. Disponível em: http://www.nlm.nih.gov/bsd/uniform_requirements.html

Clinical and Laboratory Standards Institute. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing [M100-S23]. 23. ed. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute; 2013.

Dahlén G, Blomqvist S, Almstahl A, Carlén A. Virulence factors and antibiotic susceptibility in Enterococci isolated from oral mucosal and deep infections. *J Oral Microbiol.* 2012;4:1-7.

Drury JL, Mooney DJ. Hydrogels for tissue engineering scaffold design variables. *Biomaterials.* 2003;(24):4337–51.

Endo MS, Ferraz CC, Zaia AA, Almeida JF, Gomes BP. Quantitative and qualitative analysis of microorganisms in root-filled teeth with persistent infection: Monitoring of the endodontic retreatment. *Eur J Dent.* 2013;7(3):302-9.

Feng K, Sun H, Bradley MA, Dupler EJ, Giannobile W, Ma X. Novel Antibacterial Nanofibrous PLLA Scaffold. *J Control Release.* 2010;146(3):363-9.

Ferrari PH, Bombana AC. A infecção Endodôntica e sua Resolução. São Paulo: Santos; 2010.

Ferreira EC, Silva JLL, Souza RF. As propriedades medicinais e bioquímicas da planta *Stryphnodendron adstringens* “barbatimão”. *Biol & Saúde.* 2013;11(3):14-32.

Janjić K, Cvikl B, Moritz A, Agis A. Dental pulp regeneration. *Int J Stomatol Occlusion Med.* 2016;8(Suppl 1):1–9.

Jorge AO. Microbiologia e Imunologia Oral. Rio de Janeiro: Elsevier; 2012.

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

Leal SC. Células-tronco derivadas de polpa dentária humana: propriedades e perspectivas. *Rev Dental Press Ortodon Ortopi Facial.* 2007;(12)4:17-8.

Lima CR, Silva LA, Rabelo RE, Vulcani VA, Assis BM, Lopes WD, et al. Cremes de barbatimão e quitosana como adjuvantes na cicatrização feridas cutâneas em coelhos. *Semina Cien Agrar* 2016;37(3):1317-26.

Luiz RL, Vila TV, Mello JC, Nakamura CV, Rozental S, Ishida K. Proanthocyanidins polymeric tannin from *Stryphnodendron adstringens* are active against *Candida albicans* biofilms. BMC Complement Altern Med. 2015;15:68.

Melo JO, Endo TH, Amado LE, Svidzinski AE, Baroni S, Mello JC, et al. Effect of *Stryphnodendron adstringens* (barbatimão) bark on animal models of nociception. RBCF. 2007;(43)3:465-9.

Monteiro JM, Albuquerque UP, Araújo EL. Taninos: uma abordagem da química à ecologia. Quim Nova 2005;(28)5:892-6.

Nascimento MW, Veríssimo RC, Bastos ML, Bernardo TH. Medicinal plants indications from herbal healers for wound treatment. [internet]. Rev Eletr Enf. 2016 [acesso em 2016 Nov 10];18:e1152. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.5216/ree.v18.31143>.

Oliveira JR, Castro VC, Vilela PG, Camargo SE, Carvalho CA, Jorge A, et al. Cytotoxicity of Brazilian plant extrats against oral microorganism of interest to dentistry. BMC Complement Altern Med. 2013;(13):208.

Passaretti T, Guarnieri AP, Filipini R, Alves BC, Fonseca FL. Effective use of Barbatiman (*Stryphnodendron barbatiman*) in the healing process of lesions: a literature review. ABCS Health Sci. 2016; 41(1):51-4.

Popat k. Nanotechnology in tissue and regenerative medicine. Boca Ratom: CRC Press; 2011.

Rosa V, Bona A, Cavalcanti B, Nör J. Tissue engineering: from research to dental clinics. Dent Mater, 2012;28(4):341–8.

Ruckh TT, Oldinski RA, Carroll DA, Mikhova K, Bryers JD, Popat KC. Antimicrobial effects of nanofiber poly(caprolactone) tissue scaffolds releasing rifampicin. J Mater Sci Mater Med. 2012;23(6):1411–20.

Santos Filho PR, Ferreira LA, Gouvêa CM. Protective action against chemical-induced genotoxicity and free radical scavenging activities of *Stryphnodendron adstringens* (“barbatimão”) leaf extracts. Rev. Bras. Farmacogn. 2011;21(6):1000-5.

Santos VR, Gomes R, Oliveira RR, Cortés ME, Brandão MG. Susceptibility of oral pathogenic microorganisms to aqueous and ethanolic extracts of *Stryphnodendron adstringens* (barbatimão). Int J Dent. 2004;8(1):1-5

Soares AP, Knop LA, Jesus AA, Araújo TM. Células-tronco em Odontologia. R Dental Press Ortodon Ortop Facial. 2007;(12):33-40.

Soares SP, Vinholisa AH, Casemiro LA, Silva ML, Cunha WR, Martins CH. Atividade antibacteriana do extrato hidroalcoólico de *Stryphnodendron adstringens* sobre microorganismos da cárie dental. Rev Odonto Ciênc. 2008; 23(2):141-4.

Souza TM, Moreira RR, Pietro RC, Isaac VL. Avaliação da atividade anti-séptica de extrato seco de *Stryphnodendron adstringens* (Mart.) Coville e de preparação cosmética contendo este extrato. Braz J Pharmacogn. 2007; 17(1):71-5.