UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE BAURU

ELIANE FERRAZ DA COSTA

**Influência de *Equisetum giganteum* e *Punica granatum* sobre os
fibroblastos gengivais humanos: manutenção da viabilidade**

BAURU
2017

ELIANE FERRAZ DA COSTA

Influência de *Equisetum giganteum* e *Punica granatum* sobre os fibroblastos gengivais humanos: manutenção da viabilidade

Dissertação apresentada a Faculdade de Odontologia de Bauru da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Mestre em Ciências no Programa de Ciências Odontológicas Aplicadas, na área de concentração Patologia Bucal.

Orientador: Prof^a. Dr^a. Vanessa Soares Lara

Versão corrigida

BAURU

2017

C823i Costa, Eliane Ferraz da
Influência de *Equisetum giganteum* e *Punica granatum* sobre os fibroblastos gengivais humanos: manutenção da viabilidade / Eliane Ferraz da Costa. – Bauru, 2017.
140 p.: il. 31cm.

Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Odontologia de Bauru. Universidade de São Paulo

Orientador: Prof^a. Dr^a. Vanessa Soares Lara

Nota: A versão original desta dissertação encontra-se disponível no Serviço de Biblioteca e Documentação da Faculdade de Odontologia de Bauru – FOB/USP.

Autorizo, exclusivamente para fins acadêmicos e científicos, a reprodução total ou parcial desta dissertação/tese, por processos fotocopiadores e outros meios eletrônicos.

Assinatura:

Data:

Comitê de Ética da FOB-USP
Protocolo nº: **CAAE**: 49811515.6.0000.5417
Data: 11/11/2015

FOLHA DE APROVAÇÃO

DEDICATÓRIA

*Em memória da minha mãe Elza e meu pai Paulo, que sempre
estarão presentes em mim, em minha vida e em meu coração.*

*À Paulinha, minha filha, minha companheira, minha amiga,
minha cúmplice, minha razão de viver!!! Zhu...te amo!!!*

AGRADECIMENTOS

À minha orientadora e querida amiga Prof^a. Dr^a. Vanessa Soares Lara, o meu maior agradecimento pela sua paciência, disponibilidade e orientação nessa nossa relação orientador-orientando durante esses três anos. Sou imensamente grata por tudo, que ultrapassa essa orientação, mas pela minha admiração pela sua sabedoria em ser quem você é, do bem e sempre para o bem! Agradeço, sobretudo, o privilégio de ter trabalhado com uma pessoa como você, “impar”, na vida de seus orientandos e na vida de seus amigos. O orgulho de ter sido sua orientanda e fazer parte de seu grupo de “Super Amigas” não cabe em mim! MUITÍSSIMO obrigada pela coragem e confiança!

Obrigada aos professores do departamento de Cirurgia, Estomatologia, Patologia e Radiologia: Prof. Dr. Alberto Consolaro, Prof^a. Dr^a. Denise Tostes Oliveira e Prof. Dr. Luís Antônio de Assis Taveira, pelos momentos de ensinamentos e descontração.

Às funcionárias do Departamento de Cirurgia, Estomatologia, Patologia e Radiologia, Fátima Aparecida Silveira, Maria Cristina Carrara Filipe, Marina dos Santos Corrêa e Viviane Aparecida Parise Santos, pela disponibilidade e cortesia que sempre estiveram presentes em vocês.

À Prof^a. Dr^a Anne Lígia Dokkedal, por ter aberto as portas do seu laboratório para a etapa inicial da realização desta pesquisa, pela orientação, colaboração e confiança depositada a mim.

Ao Ms. Luiz Leonardo Saldanha, muito obrigada pelos ensinamentos e ajuda na realização dos protocolos com o material vegetal. Admirável sua competência!

Obrigada ao André Luiz Giles de Oliveira, seu conhecimento de plantas foi essencial para a coleta do material vegetal.

À minha companheira de mestrado, Nara Lígia Martins Almeida, por todas as noites de estudo, ajudas nos seminários, erros e aprendizados nas aulas de interpretações de lâminas, cuidados com os

nossos extratos vegetais nos sábados, domingos, feriados e também pelas nossas conversas, medos e momentos de “relax”. O nosso santo bateu e bateu muito forte! Já te falei...você é uma “menina” que sabe ser criança e sabe ser gente grande.... Muito grande!!! Desejo à você minha amiga, toda a felicidade e sucesso desse mundo!!! E aos meus sempre fiéis e queridos companheiros do Departamento de Cirurgia, Estomatologia, Patologia e Radiologia, **Agnes Assao**, sempre quietinha e sempre presente, **Rafaela Alves da Silva Alavarce**, minha grande admiração pela sua capacidade e paixão por aquilo que faz, **José Burgos Ponce** (Pepe), por me salvar na última etapa dos meus experimentos com a sua capacidade de ter e fazer amigos, **Karen Henriette Pinke**, obrigada pela sua vontade e determinação, você foi peça fundamental na realização de tudo isso, **Heliton Gustavo de Lima**, pela sua alegria de viver e sua vocação de ser e fazer feliz quem está ao seu redor. Obrigada por isso e por tudo o que passamos juntos nesses três anos! Torço por todos e tenho certeza que com vocês.... Tudo é sucesso!!!

*A **Adriana Arruda**, **Cintia Tokuhara**, **Gabriela Silva Neubern de Oliveira**, **Nathália Martins Lopes** e **Priscila Salomão**, minhas companheiras de Centro Integrado de Pesquisa (CIP), vocês estiveram sempre presentes nessa etapa da minha vida, emprestando materiais, doando tempo, repassando ensinamentos, enfim, “trocando figurinhas”. Meu muito obrigada, adorei conhecer e conviver com vocês!*

*Ao **Prof. Dr. Rodrigo Cardoso de Oliveira**, coordenador do CIP, pela permissão da realização desta pesquisa nas dependências sob sua responsabilidade.*

*Aos funcionários do CIP, **Márcia Sirlene Zardin Graeff**, **Marcelo Milanda Ribeiro Lopes** e **Rafaela Alves da Silva Alavarce**, pela disponibilidade, competência e profissionalismo nesses três anos em que estive presente com vocês. Obrigada por tudo!*

*À **Profª. Drª. Carla Andreotti Damante** do Departamento de Prótese e Periodontia da FOB- USP, que a partir de amostras teciduais cirúrgicas obtidas nas dependências da Clínica de Periodontia desta faculdade, disponibilizou amostras celulares para a realização desse trabalho.*

AGRADECIMENTOS INSTITUCIONAIS

*Ao Jardim Botânico de Bauru, na pessoa do diretor **Luís Carlos Almeida Neto** que muito colaborou com a realização desta pesquisa, autorizando a coleta do material vegetal.*

*Ao Departamento de Cirurgia, Estomatologia, Patologia e Radiologia, da FOB/USP, na pessoa do chefe **Prof. Dr. Osny Ferreira Júnior**.*

*Ao Curso de Pós-Graduação em Ciências Odontológicas Aplicadas, na Área de Concentração em Patologia Bucal da Faculdade de Odontologia de Bauru- USP, na pessoa da **Profª. Drª. Denise Tostes Oliveira**, responsável por esta área.*

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPQ), pela oportunidade e disponibilização da minha bolsa de Mestrado.

*À Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” (UNESP/BAURU), na pessoa da excelentíssima diretora **Profª. Drª. Dagmar Aparecida Cynthia França Hunger**.*

*À Faculdade de Odontologia de Bauru - USP na pessoa da excelentíssima diretora **Profª. Drª. Maria Aparecida de Andrade Moreira Machado**.*

*À Comissão da Pós-Graduação da Faculdade de Odontologia de Bauru, na pessoa do Presidente, **Prof. Dr. Guilherme dos Reis Pereira Janson***

“Se não houver frutos, valeu a beleza das flores...Se não houver flores, valeu a sombra das folhas... Se não houver folhas, valeu a intenção da semente...”

Henfil

RESUMO

Estudos relataram a atividade antimicrobiana de *Equisetum giganteum* (cavalinha) e *Punica granatum* (romã), reduzindo o risco do desenvolvimento da estomatite protética, doença relacionada principalmente à colonização das próteses removíveis totais pelo fungo *Candida albicans*. Diante disso, é necessário que essas plantas sejam bem toleradas pelos tecidos bucais e, se possível, auxiliem no processo de reparo. **Objetivo:** Realizar um estudo fitoquímico de substâncias potencialmente ativas de *Equisetum giganteum* e *Punica granatum* e avaliar a viabilidade de fibroblastos gengivais humanos frente a diferentes concentrações destas plantas, após diferentes períodos *in vitro*. **Material e Métodos:** Após a identificação dos compostos das plantas por HPLC-PAD (High Performance Liquid Chromatography-Photodiode Array Detector), foram selecionadas as frações com melhor atividade antifúngica perante *Candida albicans*. Os extratos brutos e frações selecionadas de *P. granatum* e *E. giganteum* foram testados em diferentes concentrações (0.23, 0.47, 0.94, 1.88, 3.75, 7.5, 15 e 30 mg) e períodos (12, 24, 36 e 60 h) sobre fibroblastos gengivais humanos (FGH), pelo kit comercial LIVE/DEAD® (Viability/Cytotoxicity Kit, L-3224). Por meio desse ensaio, analisamos quantitativamente a viabilidade celular através das leituras das unidades relativas de fluorescência (URF) e qualitativamente por meio da análise da morfologia e da densidade observadas pela microscopia invertida de fluorescência. Após três experimentos independentes para cada período de avaliação. Os resultados quantitativos paramétricos foram representados como média e desvio padrão (SD) com análise de Variância ANOVA- One-Way, seguida da análise comparativa pelo teste de Tukey HSD. Os resultados quantitativos não paramétricos foram apresentados como mediana e quartis e foram submetidos ao teste de Kruskal-Wallis, seguido de análise comparativa pelo teste de Dunn, de acordo com as análises de normalidade (Teste de Kolmogorov-Smirnov). Valores de $p < 0.05$ foram indicativos de significância estatística. **Conclusões:** Foram identificados compostos fenólicos, como flavonoides e taninos em *E.giganteum* e *P. granatum*, respectivamente. Identificamos uma citotoxicidade concentração-dependente para as duas plantas testadas, independente do tempo. Sob as menores concentrações

das plantas a viabilidade e a morfologia dos FGH foram preservadas. Dentro deste contexto, acreditamos na possibilidade de se utilizar essas plantas como terapia alternativa em diversas áreas de saúde, porém em concentrações biocompatíveis.

Palavras-chave¹: Fibroblastos gengivais humanos. Citotoxicidade. Viabilidade. *Equisetum giganteum*. *Punica granatum*. Biocompatibilidade.

¹ Em acordo com os Descritores em Ciências da Saúde (DeCS), disponíveis no domínio <http://decs.bvr.br/>

ABSTRACT

Influence of *Equisetum giganteum* and *Punica granatum* on fibroblasts: maintenance of viability

Studies have reported the antimicrobial activity of *Equisetum giganteum* (horsetail) and *Punica granatum* (pomegranate), reducing the risk of developing of denture stomatitis, a disease mainly related to the colonization of total removable dentures by the fungus *Candida albicans*. In view of this, it is necessary that such plants be well tolerated by the buccal tissues and, if possible, assist in the repair process.

Objective: To carry out a phytochemical study of potentially active substances of *E. giganteum* and *P. granatum* and to evaluate the viability of human gingival fibroblasts against different concentrations of these two plants, after different periods *in vitro*.

Material and Methods: After the identification of the plant compounds by HPLC-PAD (High Performance Liquid Chromatography-Photodiode Array Detector), the fractions with the best antifungal activity against *Candida albicans* were selected. The crude extracts and selected fractions of *P. granatum* and *E. giganteum* were tested at different concentrations (0.23, 0.47, 0.94, 1.88, 3.75, 7.5, 15 and 30 mg) and periods (12, 24, 36 and 60 h) against human gingival fibroblasts (FGH), for the evaluation of their possible cytotoxicity through the analysis of the viability of FGH by the commercial kit LIVE / DEAD® (Viability / Cytotoxicity Kit, L-3224). By means of this assay we quantitatively analyzed the cell viability through the readings of the relative units of fluorescence (URF) and qualitatively by analysis of the cellular morphology and density using inverted fluorescence microscopy, after three independent experiments. The parametric quantitative results were represented as mean and standard deviation (SD) with ANOVA-One-Way Variance analysis, followed by comparative analysis by the Tukey HSD test. The non-parametric quantitative results were presented as medians and quartiles and were submitted to the Kruskal-Wallis test, followed by comparative analysis by the Dunn test, according to normality tests (Kolmogorov-Smirnov test). Values of $p < 0.05$ were indicative of statistical significance. **Conclusions:** Phenolic compounds, such as flavonoids and tannins, were identified in *E. giganteum* and *P. granatum*, respectively. We identified a concentration-dependent cytotoxicity for the two plants tested, regardless of the time.

Under the lowest concentrations of plants the viability and morphology of FGH were preserved when compared to the control. Within this context, we believe in the possibility to use these plants as alternative therapy in several health areas, but in biocompatible concentrations.

Key words: Human gingival fibroblasts. Cytotoxicity. Viability. *Equisetum giganteum*. *Punica granatum*. Biocompatibility

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

- Figura 1** - Processos implicados na obtenção do extrato bruto (EtOH 70%) de *E. giganteum* e *P. granatum*.....49
- Figura 2** - Procedimentos envolvidos na obtenção do extrato bruto (EtOH 70%) e das frações (CH₂Cl₂, AcOEt e *n*-BuOH) por Extração Líquido-Líquido (ELL) de *E. giganteum* (fonte: SALDANHA L L. Prospecção química e avaliação das atividades antioxidante e alelopática de *Myrcia bella* Cambess. [Mestrado]. Botucatu: Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, Instituto de Biociências de Botucatu; 2013).....51
- Figura 3** - Procedimentos envolvidos na obtenção do extrato bruto (EtOH 70%) e das frações (AcOEt e *n*-BuOH) por Extração Líquido-Líquido (ELL) de *P. granatum* (fonte: SALDANHA L L. Prospecção química e avaliação das atividades antioxidante e alelopática de *Myrcia bella* Cambess. [Mestrado]. Botucatu: Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, Instituto de Biociências de Botucatu; 2013)...51
- Figura 4** - Demonstrativo da diluição em série utilizada para as preparações das concentrações de extratos brutos e frações56
- Figura 5** - Comparação dos percentuais (médias ou medianas) de viabilidade dos FGH, após contato com as diferentes concentrações de EB EtOH 70% do *E. giganteum*, ou com o meio de cultura (Controle - C, considerado 100% de viabilidade), em cada um dos períodos avaliados. Dados representativos de três experimentos independentes, obtidos por meio do ensaio LIVE/DEAD. Símbolos diferentes (*, # e &) representam diferenças estatísticas significativas entre si (p<0.05). A letra a representa p<0.05 em relação ao Controle.....67
- Figura 6** - Aspectos morfológicos dos FGH após 12 h em contato com as diferentes concentrações (0.23, 0.47, 0.94, 1.88, 3.75, 7.5, 15 ou 30 mg/mL) do EB EtOH 70% de *E. giganteum*. Como controles, FGH foram mantidos apenas em meio de cultura (Meio) ou expostos ao Metanol para indução da morte das células. Microscopia invertida de fluorescência; tamanho final 100 x69
-
-

-
-
- Figura 7** - Aspectos morfológicos dos FGH após 24 h em contato com as diferentes concentrações (0.23, 0.47, 0.94, 1.88, 3.75, 7.5, 15 ou 30 mg/mL) do EB EtOH 70% de *E. giganteum*. Como controles, FGH foram mantidos apenas em meio de cultura (Meio) ou expostos ao Metanol para indução da morte das células. Microscopia invertida de fluorescência; tamanho final 100 x.....71
- Figura 8** - Aspectos morfológicos dos FGH após 36 h em contato com as diferentes concentrações (0.23, 0.47, 0.94, 1.88, 3.75, 7.5, 15 ou 30 mg/mL) do EB EtOH 70% de *E. giganteum*. Como controles, FGH foram mantidos apenas em meio de cultura (Meio) ou expostos ao Metanol para indução da morte das células. Microscopia invertida de fluorescência; tamanho final 100 x.....73
- Figura 9** - Aspectos morfológicos dos FGH após 60 h em contato com as diferentes concentrações (0.23, 0.47, 0.94, 1.88, 3.75, 7.5, 15 ou 30 mg/mL) do EB EtOH 70% de *E. giganteum*. Como controles, FGH foram mantidos apenas em meio de cultura (Meio) ou expostos ao Metanol para indução da morte das células. Microscopia invertida de fluorescência; tamanho final 100 x.....75
- Figura 10** - Comparação dos percentuais (médias ou medianas) de viabilidade dos FGH, após contato com as diferentes concentrações de CH₂Cl₂ do *E. giganteum*, ou com o meio de cultura (Controle - C, considerado 100% de viabilidade), em cada um dos períodos avaliados. Dados representativos de três experimentos independentes, obtidos por meio do ensaio LIVE/DEAD. Símbolos diferentes (*, # e &) representam diferenças estatísticas significativas entre si (p<0.05). A letra a representa p<0.05 em relação ao Controle.....78
- Figura 11** - Aspectos morfológicos dos FGH após 12 h em contato com as diferentes concentrações (0.23, 0.47, 0.94, 1.88, 3.75, 7.5, 15 ou 30 mg/mL) de CH₂Cl₂ de *E. giganteum*. Como controles, FGH foram mantidos apenas em meio de cultura (Meio) ou expostos ao Metanol para indução da morte das células. Microscopia invertida de fluorescência; tamanho final 100 x.....81
- Figura 12** - Aspectos morfológicos dos FGH após 24 h em contato com as diferentes concentrações (0.23, 0.47, 0.94, 1.88, 3.75, 7.5, 15 ou 30 mg/mL) de CH₂Cl₂ de *E. giganteum*. Como controles, FGH foram mantidos apenas em meio de cultura (Meio) ou expostos ao Metanol para indução da morte das células. Microscopia invertida de fluorescência; tamanho final 100 x.....83
-
-

-
-
- Figura 13** - Aspectos morfológicos dos FGH após 36 h em contato com as diferentes concentrações (0.23, 0.47, 0.94, 1.88, 3.75, 7.5, 15 ou 30 mg/mL) de CH₂Cl₂ de *E. giganteum*. Como controles, FGH foram mantidos apenas em meio de cultura (Meio) ou expostos ao Metanol para indução da morte das células. Microscopia invertida de fluorescência; tamanho final 100 x.....85
- Figura 14** - Aspectos morfológicos dos FGH após 60 h em contato com as diferentes concentrações (0.23, 0.47, 0.94, 1.88, 3.75, 7.5, 15 ou 30 mg/mL) de CH₂Cl₂ de *E. giganteum*. Como controles, FGH foram mantidos apenas em meio de cultura (Meio) ou expostos ao Metanol para indução da morte das células. Microscopia invertida de fluorescência; tamanho final 100 x.....87
- Figura 15** - Comparação dos percentuais (médias ou medianas) de viabilidade dos FGH, após contato com as diferentes concentrações do EB EtOH 70% CH₂Cl₂ de *P. granatum*, ou com o meio de cultura (Controle - C, considerado 100% de viabilidade), em cada um dos períodos avaliados. Dados representativos de três experimentos independentes, obtidos por meio do ensaio LIVE/DEAD. Símbolos diferentes (*, # e &) representam diferenças estatísticas significativas entre si (p<0.05). A letra a representa p<0.05 em relação ao Controle.....90
- Figura 16** - Aspectos morfológicos dos FGH após 12 h em contato com as diferentes concentrações (0.23, 0.47, 0.94, 1.88, 3.75, 7.5, 15 ou 30 mg/mL) do EB EtOH 70% de *P. granatum*. Como controles, FGH foram mantidos apenas em meio de cultura (Meio) ou expostos ao Metanol para indução da morte das células. Microscopia invertida de fluorescência; tamanho final 100 x.....93
- Figura 17** - Aspectos morfológicos dos FGH após 24 h em contato com as diferentes concentrações (0.23, 0.47, 0.94, 1.88, 3.75, 7.5, 15 ou 30 mg/mL) do EB EtOH 70% de *P. granatum*. Como controles, FGH foram mantidos apenas em meio de cultura (Meio) ou expostos ao Metanol para indução da morte das células. Microscopia invertida de fluorescência; tamanho final 100 x.....95
- Figura 18** - Aspectos morfológicos dos FGH após 36 h em contato com as diferentes concentrações (0.23, 0.47, 0.94, 1.88, 3.75, 7.5, **15 ou** 30 mg/mL) do EB EtOH 70% de *P. granatum*. Como controles, FGH foram mantidos apenas em meio de cultura (Meio) ou expostos ao Metanol para indução da morte das células. Microscopia invertida de fluorescência; tamanho final 100 x.....97
-
-

-
-
- Figura 19** - Aspectos morfológicos dos FGH após 60 h em contato com as diferentes concentrações (0.23, 0.47, 0.94, 1.88, 3.75, 7.5, 15 ou 30 mg/mL) do EB EtOH 70% de *P. granatum*. Como controles, FGH foram mantidos apenas em meio de cultura (Meio) ou expostos ao Metanol para indução da morte das células. Microscopia invertida de fluorescência; tamanho final 100 x.99
- Figura 20** - Comparação dos percentuais (médias ou medianas) de viabilidade dos FGH, após contato com as diferentes concentrações de AcOEt de *P. granatum*, ou com o meio de cultura (Controle - C, considerado 100% de viabilidade), em cada um dos períodos avaliados. Dados representativos de três experimentos independentes, obtidos por meio do ensaio LIVE/DEAD. Símbolos diferentes (*, # e &) representam diferenças estatísticas significativas entre si ($p < 0.05$). A letra a representa $p < 0.05$ em relação ao Controle102
- Figura 21** - Aspectos morfológicos dos FGH após 12 h em contato com as diferentes concentrações (0.23, 0.47, 0.94, 1.88, 3.75, 7.5, 15 ou 30 mg/mL) de AcOEt de *P. granatum*. Como controles, FGH foram mantidos apenas em meio de cultura (Meio) ou expostos ao Metanol para indução da morte das células. Microscopia invertida de fluorescência; tamanho final 100 x.....105
- Figura 22** - Aspectos morfológicos dos FGH após 24 h em contato com as diferentes concentrações (0.23, 0.47, 0.94, 1.88, 3.75, 7.5, 15 ou 30 mg/mL) de AcOEt de *P. granatum*. Como controles, FGH foram mantidos apenas em meio de cultura (Meio) ou expostos ao Metanol para indução da morte das células. Microscopia invertida de fluorescência; tamanho final 100 x.....107
- Figura 23** - Aspectos morfológicos dos FGH após 36 h em contato com as diferentes concentrações (0.23, 0.47, 0.94, 1.88, 3.75, 7.5, 15 ou 30 mg/mL) de AcOEt de *P. granatum*. Como controles, FGH foram mantidos apenas em meio de cultura (Meio) ou expostos ao Metanol para indução da morte das células. Microscopia invertida de fluorescência; tamanho final 100 x.....109
- Figura 24** - Aspectos morfológicos dos FGH após 60 h em contato com as diferentes concentrações (0.23, 0.47, 0.94, 1.88, 3.75, 7.5, 15 ou 30 mg/mL) de AcOEt de *P. granatum*. Como controles, FGH foram mantidos apenas em meio de cultura (Meio) ou expostos ao Metanol para indução da morte das células. Microscopia invertida de fluorescência; tamanho final 100 x.....111
-
-

LISTA DE GRÁFICOS

- Gráfico 1** - Percentuais de viabilidade *in vitro* de FGH, na presença das diferentes concentrações (0.23, 0.47, 0.94, 1.88, 3.75, 7.5, 15 e 30 mg/mL) do EB EtOH 70% de *E. giganteum*, nos períodos de 12, 24, 36 e 60 h. Os percentuais foram obtidos em comparação àqueles referentes ao controle (Meio). Concentrações que resultaram em viabilidade celular menor que 70% (percentual demarcado por linha vermelha) foram consideradas citotóxicas, segundo padrão internacional ISO nº 10993-5. Dados representativos de três experimentos independentes, obtidos pelo kit comercial LIVE/DEAD® (Viability/Cytotoxicity Kit, L-3224)66
- Gráfico 2** - Percentuais de viabilidade *in vitro* de FGH, na presença das diferentes concentrações 0.23, 0.47, 0.94, 1.88, 3.75, 7.5, 15 e 30 mg/mL da fração CH₂Cl₂ de *E. giganteum*, nos períodos de 12, 24, 36 e 60 h. Os percentuais foram obtidos em comparação àqueles referentes ao controle (Meio). Concentrações que resultaram em viabilidade celular menor que 70% (percentual demarcado por linha vermelha) foram consideradas citotóxicas, segundo padrão internacional ISO nº 10993-5. Dados representativos de três experimentos independentes, obtidos pelo kit comercial LIVE/DEAD® (Viability/Cytotoxicity Kit, L-3224)77
- Gráfico 3** - Percentuais de viabilidade *in vitro* de FGH, na presença das diferentes concentrações 0.23, 0.47, 0.94, 1.88, 3.75, 7.5, 15 e 30 mg/mL do EB EtOH 70% de *P. granatum* nos períodos de 12, 24, 36 e 60 h. Os percentuais foram obtidos em comparação àqueles referentes ao controle (Meio). Concentrações que resultaram em viabilidade celular menor que 70% (percentual demarcado por linha vermelha) foram consideradas citotóxicas, segundo padrão internacional ISO nº 10993-5. Dados representativos de três experimentos independentes, obtidos pelo kit comercial LIVE/DEAD® (Viability/Cytotoxicity Kit, L-3224)89
- Gráfico 4** - Percentuais de viabilidade *in vitro* de FGH, na presença das diferentes concentrações 0.23, 0.47, 0.94, 1.88, 3.75, 7.5, 15 e 30 mg/mL de AcOEt de *P. granatum* nos períodos de 12, 24, 36 e 60 h. Os percentuais foram obtidos em comparação àqueles referentes ao controle (Meio). Concentrações que resultaram em viabilidade celular menor que 70% (percentual demarcado por linha vermelha) foram consideradas citotóxicas, segundo padrão internacional ISO nº 10993-5. Dados representativos de três experimentos independentes, obtidos pelo kit comercial LIVE/DEAD® (Viability/Cytotoxicity Kit, L-3224)101
-
-

LISTA DE TABELAS

- Tabela 1** - Nomenclatura dos grupos experimentais, considerando a concentração e o fitoterápico58
- Tabela 2** - Compostos identificados a partir das partes aéreas de *E. giganteum* por HPLC-PAD. A sigla **n.i.** representa compostos não identificados.64
- Tabela 3** - Compostos identificados a partir das cascas dos frutos de *P. granatum* por HPLC-PAD. A sigla **n.i.** representa compostos não identificados.65
- Tabela 4** - Valores percentuais da média e mediana, resultado mínimo, máximo e desvio padrão (D.P.) do teste de viabilidade, obtidos a partir do contato dos FGH com as diferentes concentrações (0.23, 0.47, 0.94, 1.88, 3.75, 7.5, 15 e 30 mg/mL) do EB EtOH 70% de *E. giganteum*, nos períodos de 12, 24, 36 e 60 h68
- Tabela 5** - Valores percentuais da média e mediana, resultado mínimo, máximo e desvio padrão (D.P.) do teste de viabilidade, obtidos a partir do contato dos FGH com as diferentes concentrações (0.23, 0.47, 0.94, 1.88, 3.75, 7.5, 15 e 30 mg/mL) da fração CH₂Cl₂ de *E. giganteum*, nos períodos de 12, 24, 36 e 60 h79
- Tabela 6** - Valores percentuais da média e mediana, resultado mínimo, máximo e desvio padrão (D.P.) do teste de viabilidade, obtidos a partir do contato dos FGH com as diferentes concentrações (0.23, 0.47, 0.94, 1.88, 3.75, 7.5, 15 e 30 mg/mL) do EB EtOH 70% de *P. granatum*, nos períodos de 12, 24, 36 e 60 h91
- Tabela 7** - Valores percentuais da média e mediana, resultado mínimo, máximo e desvio padrão (D.P.) do teste de viabilidade, obtidos a partir do contato dos FGH com as diferentes concentrações (0.23, 0.47, 0.94, 1.88, 3.75, 7.5, 15 e 30 mg/mL) da fração AcOEt de *P. granatum*, nos períodos de 12, 24, 36 e 60 h103
-
-

LISTA DE ABREVIATURA E SIGLAS E SÍMBOLOS

AcOET	Fração acetato de etila
ATCC	American Type Culture Collection
BHI	Brain Heart Infusion
<i>C. albicans</i>	<i>Candida albicans</i>
CH ₂ Cl ₂	Fração diclorometânica
CIM	Concentração Inibitória Mínima
cm ³	Centímetro cúbico
CO ₂	Dióxido de Carbono
d.i.	Diâmetro interno
DEMEM	Dulbecco's Modified Eagles Medium
DAPI	Dicloridrato de 4',6-diamidino-2-fenilindol
DMSO	Dimetilsulfóxido
<i>E. giganteum</i>	<i>Equisetum giganteum</i>
EB	Extrato Bruto
EDTA	Ácido etilenodiamino tetra-acético
ELL	Extração Líquido-Líquido
ETOH70%	Etanol 70 por cento
FGH	Fibroblastos gengivais humanos
g	Gramas
h	Horas
H ₂ O	Água
HPLC-PAD	<i>High Performance Liquid Chromatography-Photodiode Array Detector</i> (Cromatografia Líquida de Alta Eficiência acoplada com Detector de Arranjo de Fotodiodos)
Kg	Quilogramas
L	Litros
máx	Máximo
MeOH	Metanol
mg	Miligramas
mg/mL	Miligramas por mililitro

min	Mínimo
mL	Mililitros
MTT	Brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-yl)-2,5-difeniltetrazólio
n-BuOH	Fração Butanólica
n.i.	Não identificados
nm	Nanometros
O ₂	Oxigênio
°C	Graus Celsius
overnight	Permanecer durante a noite
<i>P. granatum</i>	<i>Punica granatum</i>
PBS	Solução Salina Tamponada em Fosfato (<i>Phosphate Buffered Saline</i>)
rpm	Rotações por minuto
RPMI	<i>Roswell Park Memorial Institute</i>
SBF	Soro bovino fetal
SD	Desvio padrão
TSB	<i>Tryptic Soy Broth</i> (Caldo Trípico de Soja)
UFC/ml	Unidades formadoras de colônias por mililitro
UNBA	Herbário da UNESP de Bauru
URFs	Unidades relativas de fluorescência
UV	Ultravioleta
YEPD	Yest Peptone Dextrose
v/v	Percentual volume/volume
XTT	2,3 Bis (2-Methoxy-4-Nitro-5- Sulfophenil) – 5 - [(Phenyl-Amino) Carbonyl] – 2H - Tetrazolium Hidroxide
λ	Comprimento de onda
μL	Microlitros
μM	Micromolar
%	Porcentagem
®	Marca registrada
°	Graus

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	21
2	SÍNTESE BIBLIOGRÁFICA.....	27
2.1	Plantas medicinais e fitoterápicos.....	29
2.2	<i>Equisetum giganteum</i>	31
2.3	<i>Punica granatum</i>	34
2.4	Cultura celular e citotoxicidade	35
3	PROPOSIÇÃO	41
3.1	Objetivos Específicos	43
4	MATERIAL E MÉTODOS.....	45
4.1	Coleta do material vegetal	47
4.2	Obtenção dos extratos brutos (EB Et OH 70%).....	48
4.3	Obtenção das frações de <i>E. giganteum</i> e <i>P. granatum</i> por Extração Líquido – Líquido (ELL)	49
4.4	Seleção das frações de <i>E. giganteum</i> e <i>P. granatum</i>	51
4.5	Identificação dos compostos por HPLC – PAD	53
4.6	Cultivo dos fibroblastos gengivais humanos (FGH).....	54
4.6.1	Descongelamento	54
4.6.2	Subcultivo e expansão dos FGH	55
4.6.3	Quantificação dos FGH	55
4.7	Preparo das concentrações de <i>E. giganteum</i> e de <i>P. granatum</i>	56
4.8	Grupos experimentais.....	57
4.9	Ensaio de viabilidade celular	58
4.10	Análise dos resultados.....	60

5	RESULTADOS	61
5.1	Estudo fitoquímico das substâncias ativas de <i>E. giganteum</i> e <i>P. granatum</i>	63
5.1.1	<i>E. giganteum</i>	63
5.1.2	<i>P. granatum</i>	64
5.2	Viabilidade dos FGH frente às diferentes concentrações do extrato bruto e das frações dos fitoterápicos, <i>E. giganteum</i> ou <i>P. granatum</i> , após diferentes períodos	65
5.2.1	<i>E. giganteum</i> (EB EtOH 70%)	65
5.2.2	<i>E. giganteum</i> (CH ₂ Cl ₂)	77
5.2.3	<i>P. granatum</i> (EB EtOH 70%)	87
5.2.4	<i>P. granatum</i> (AcOEt)	99
6	DISCUSSÃO	113
7	CONCLUSÕES	123
	REFERÊNCIAS	127

1 INTRODUÇÃO

1 INTRODUÇÃO

Apesar dos avanços da medicina moderna, as plantas permanecem como importantes opções terapêuticas na área da saúde. Extratos de ervas ou de óleos essenciais preparados a partir de plantas medicinais contêm diferentes compostos com numerosas atividades biológicas, confirmadas *in vitro* e *in vivo*, tais como antibacterianas, antifúngicas, antivirais, antiprotozoários, anti-helmínticos, antissépticos, anti-inflamatórios, antineoplásicas, antioxidantes, antialérgicas, anticonvulsivantes, antidepressivas, anticoncepcionais, analgésicas, bem como propriedades diuréticas e inibidoras de mutação genética. Alguns compostos são utilizados para o tratamento da diabetes, de doença de Alzheimer, de doenças periodontais, de infertilidade masculina e de disfunção erétil (OLIVEIRA, 2013).

Equisetum spp. representa um gênero de maior repercussão dentre todas as plantas vasculares, pela sua ampla distribuição no espaço físico e ecológico (ROTHWELL, 1996), sendo constituído por 15 espécies conhecidas popularmente como cavalinhas. A espécie *Equisetum giganteum* (*E. giganteum*), também conhecida como cavalinha, *cola de caballo* ou rabo de cavalo gigante, é uma planta nativa da América Central e do Sul. Os métodos para a preparação desta espécie, principalmente decocção e infusão, são amplamente usados na medicina tradicional para obtenção de agentes diuréticos, hemostáticos e anti-inflamatórios (LEAL et al., 1999). Estudos farmacológicos em ratos revelaram que os extratos de *E. giganteum* apresentam efeitos antimicrobianos e diuréticos, e simultaneamente ausência de toxicidade bucal aguda. Outras espécies de *Equisetum* demonstraram atividades antioxidante, anticonceptiva e anti-inflamatória (PÉREZ; LAGUNA; WALKOWSKI, 1985; CÁCERES; GIRÓN; MARTÍNEZ, 1987; GORZALCZANY et al., 1999). Ainda neste contexto, o extrato hidroalcolólico de *E. giganteum* demonstra ser um potente agente antimicrobiano e antiaderente frente a biofilmes de *Candida albicans* (*C. albicans*), induzido sobre a superfície de resina acrílica termopolimerizável, sugerindo a utilização desse extrato como meio alternativo na terapêutica odontológica (ALAVARCE, 2014; ALAVARCE et al., 2015).

Da família *Punicaceae*, conhecida popularmente como romanzeira, romeira e granado, *Punica granatum* (*P. granatum*) é amplamente encontrado por todo Brasil, sendo originária da Ásia (BRAGA, 1961) e utilizada como adstringente, hemostática, antidiabética, anti-helmíntica, antidiarreica, antisséptico e antiviral. (MENEZES; PINTO; CORDEIRO, 2008). Tem sido amplamente utilizada na medicina tradicional na América, Ásia, África e Europa, para o tratamento de diferentes tipos de doenças, incluindo câncer, doenças cardiovasculares, diabetes, infertilidade masculina, doença de Alzheimer, doenças associadas ao envelhecimento e AIDS (NEURATH; STICK; DEBNATH, 2004; LANSKY; NEWMAN, 2007; JURENKA, 2008). A atividade antimicrobiana do extrato de *P. granatum*, sobre microrganismos Gram positivos e leveduras, foi relacionada a princípios ativos presentes na casca deste fruto (NAQVI; KHAN; VOHORA, 1991).

O extrato de *P. granatum* foi testado e comparado aos efeitos antifúngicos da nistatina. Os resultados obtidos sugerem bons efeitos frente a *C. albicans* (MANSOURIAN, 2014). Neste contexto, uma outra alternativa para a terapia odontológica seria a associação de *E. giganteum* e/ou de *P. granatum* a adesivos protéticos, visando auxiliar no tratamento e prevenção da estomatite protética, atuando sobre o principal agente etiológico dessa patologia, o fungo *C. albicans* (ALMEIDA, 2016).

Assim, a capacidade dos extratos de *P. granatum* e de *E. giganteum* de impedir ou diminuir a adesão e proliferação de fungos *Candida* sobre a superfície interna de próteses removíveis, principalmente totais superiores, parece constituir um importante benefício para a prevenção ou tratamento de patologias bucais, como a estomatite protética, considerada uma das formas de candidose bucal e sendo um processo inflamatório na mucosa subjacente a uma prótese total ou parcial removível, geralmente associada a presença do fungo *C. albicans* (RAMAGE et al., 2005). A etiologia da estomatite protética é multifatorial, podendo estar relacionada, além da infecção por *C. albicans*, a fatores locais como o trauma provocado por prótese mal-adaptada, bem como fatores sistêmicos, como idade e condições ou doenças imunossupressoras, os quais participam da origem, manutenção e agravamento da doença (BATISTA; BIRMAN; CURY; 1999; OLIVEIRA et al., 2000; KULAK; ARIKAN; KAZAZOGLU, 2002; LEMOS; MIRANDA; SOUZA, 2003).

Entretanto, é de suma importância descartar a capacidade citotóxica destas plantas medicinais sobre as células que compõem a mucosa bucal, como por exemplo os fibroblastos. Essas células gengivais representam o maior constituinte dos tecidos conjuntivos fibrosos, subjacentes ao revestimento epitelial, tendo função estrutural e papel fundamental no processo de cicatrização (CHAVRIER et al., 1988, TANNER; YAMAUCHI; SIMPSON, 1991). No tecido conjuntivo fibroso, os fibroblastos residem em um estado quiescente, tendo uma taxa de proliferação e atividade metabólica baixas. Quando o tecido é lesado, os fibroblastos tornam-se ativos e mudam seu padrão de expressão gênica (YER et al., 1999).

Considerando o potencial terapêutico de *E. giganteum* e de *P. granatum* para a estomatite protética associada a *C. albicans*, a proposta deste estudo foi avaliar a resposta de fibroblastos gengivais humanos *in vitro* frente a estas plantas.

2 SÍNTESE BIBLIOGRÁFICA

2 SÍNTESE BIBLIOGRÁFICA

2.1 Plantas medicinais e fitoterápicos

O poder curativo das plantas tem sido explorado pela espécie humana, desde os primórdios. Por muito tempo, as plantas medicinais representaram a única fonte de agentes terapêuticos para o homem. As primeiras civilizações perceberam que algumas plantas continham, em suas essências, princípios ativos, os quais ao serem experimentados no combate às doenças revelaram empiricamente seu poder curativo (HOSTETTMANN; QUEIROZ; VIEIRA, 2003; BADKE et al., 2011).

De uma maneira geral, o uso de plantas medicinais é erroneamente confundido com o emprego da fitoterapia. Plantas medicinais são “todos e quaisquer vegetais que possuem, em um ou mais órgãos, substâncias que podem ser utilizadas com fins terapêuticos ou sejam precursores de fármacos semi-sintéticos”, ou seja, são espécies vegetais capazes de aliviar ou curar enfermidades (ZHANG, 1998). Para usá-las, é preciso conhecer a planta e saber onde colher e como prepará-la. Quando a planta medicinal é industrializada para se obter um medicamento, tem-se como resultado o fitoterápico. O processo de industrialização evita contaminação por microrganismos, agrotóxicos e outras substâncias, além de padronizar a quantidade e a correta maneira de sua utilização, permitindo uma maior segurança de uso. Fitoterápicos, portanto, são medicamentos cujos princípios ativos são obtidos exclusivamente de drogas vegetais. São caracterizados pela eficácia e conhecimento dos riscos de seu uso, como também pela constância de sua qualidade. Sua eficácia e segurança podem ser validados através de levantamentos etnofarmacológicos de utilização, publicações científicas ou estudos farmacológicos e toxicológicos pré-clínicos e clínicos (ANVISA, 2004). Estes produtos naturais podem ser tão eficientes quanto os produzidos pela síntese química, contudo a transformação de uma planta em um medicamento deve visar à preservação da integridade química e farmacológica do vegetal, garantindo a constância de sua ação biológica e a sua segurança de utilização, além de valorizar seu potencial terapêutico. Para atingir esses objetivos, a produção de fitoterápicos requer, necessariamente, estudos prévios relativos a aspectos botânicos, agrônômicos,

fitoquímicos, farmacológicos, toxicológicos e de desenvolvimento de metodologias analíticas e tecnológicas (MIGUEL; MIGUEL, 1999).

Nas últimas duas décadas, o uso da medicina complementar e alternativa tem crescido consideravelmente em todo o mundo. Na União Europeia, a prevalência de uso de medicamentos à base de plantas varia de 5,9% a 48,3%, enquanto que, nos EUA e no Canadá, é estimada em 17,9% e 12% respectivamente (KENNEDY et al., 2013). Segundo a Organização Mundial de Saúde (OMS), cerca de 65 a 80% da população mundial, nos países em desenvolvimento, devido à pobreza e à falta de acesso à medicina moderna, dependem essencialmente de plantas para os seus cuidados de saúde primários. Alguns dos fatores importantes que contribuíram para o crescimento do mercado fitoterápico em todo o mundo são: a preferência dos consumidores por terapias naturais, uma vez que milhões de pessoas em todo o mundo utilizam ervas medicinais há milhares de anos; a preocupação com os efeitos secundários indesejáveis dos medicamentos modernos com a crença de que medicamentos à base de plantas são isentos de efeitos colaterais; crença de que os medicamentos à base de plantas poderiam trazer um benefício eficaz no tratamento de certas doenças onde terapias convencionais e medicamentos provaram ser inadequados; tendência para a automedicação e o alto custo dos medicamentos sintéticos (CALIXTO, 2000).

Em países como Estados Unidos, Bélgica, Reino Unido e Dinamarca, os fitoterápicos são comercializados como suplementos alimentares e vendidos livremente em supermercados e drogarias, juntamente com as vitaminas, não necessitando de prescrição (FISHER; WAARD, 1994). Na Alemanha, Itália, Portugal e França, são regulamentados por leis, como os medicamentos sintéticos, e seguem regras de manufatura e comercialização (BENZI; CECI, 1997). Além de seguir as recomendações da OMS, o Brasil tem a sua própria agência que regula o uso de plantas medicinais, a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), e os fitoterápicos são registrados como medicamentos, ou seja, as empresas precisam provar a sua segurança, qualidade e eficácia com base em informação científica (CALIXTO, 2000; PALHARES et al., 2015).

A falsa concepção de que *“medicamento natural, se não fizer bem, mal não faz”* contribui para que, no Brasil, segundo o Sistema de Informações Tóxico -

Farmacológicas (FIOCRUZ/CICT/SINITOX), os medicamentos ocupem o primeiro lugar entre os agentes causadores de intoxicações em seres humanos e o segundo lugar nos registros de mortes por intoxicação, embora não sejam encontrados dados específicos relacionados exclusivamente à ingestão de plantas (NICOLETTI, 2009).

A planta medicinal é um organismo estranho ao organismo humano e como todo corpo estranho, os produtos de sua biotransformação são potencialmente tóxicos até comprovação contrária. Deve-se considerar que a ingestão de uma planta medicinal ou de um fitoterápico não tem somente efeitos imediatos, mas também podem ocorrer efeitos que se instalam ao longo prazo e de forma assintomática, como carcinogênicos, hepatotóxicos e nefrotóxicos (SIMÕES, 2002). Desta forma, a produção de fitoterápicos deve atender as práticas modernas de fabricação e controle de qualidade, enfatizando os aspectos de padronização a fim de manter e garantir a constância da composição química e atividade farmacológica (BONATI, 1991).

2.2 *Equisetum giganteum*

E. giganteum é da família Equisetaceae, popularmente conhecida como "cavalinha" no Brasil e "horsetail" na América do Norte e Europa. Como indicado em seu nome, uma de suas características marcantes é o seu tamanho, sendo uma espécie pouco estudada em relação ao seu perfil químico e pouco se sabe sobre seu mecanismo. A constituição de *E. giganteum* inclui flavonoides, glicósidos de estilipironas, derivados de ácido hidroxicinâmico, metais, sílica e alguns compostos apolares em sua oleoresina, como alcanos, ácidos graxos, ésteres metílicos e triterpenos esteróides. *E. giganteum* ocorre das Grandes Antilhas à América Central, Chile, Argentina e Brasil (KIMBER; DERMAN, 2002, FARINON et al., 2013). No Brasil, ocorre no Centro-Oeste (Mato Grosso, Mato Grosso do Sul, Goiás e Distrito Federal), Nordeste (Bahia), Sudeste (Minas Gerais, São Paulo e Rio de Janeiro) e Sul (Paraná, Santa Catarina e Rio Grande do Sul), sendo ainda encontrado no cerrado de Bauru (ARANTES; PRADO; RANAL, 2010).

No Brasil e na Argentina, a droga é amplamente utilizada e comercializada como matéria-prima para remédios à base de plantas e como suplemento alimentar. Nestes e em outros países da América Latina, *E. giganteum* é comumente usado como substituto de *Equisetum Arvense*, que é uma das plantas medicinais mais prescritas. Esta planta é encontrada nas Américas, Europa, África e Ásia, e é tradicionalmente usada como diurético e anti-inflamatório. Estudos pré-clínicos revelaram ações farmacológicas com propriedades antioxidantes e antidiabéticas sem hepatotoxicidade aguda. Existem também relatos de uso tópico como adjuvante, no tratamento de feridas de difícil cura. Entretanto, ainda não satisfaz requisitos das Agências Europeias de Medicamentos, concluindo que dados clínicos sobre absorção, distribuição e farmacocinética são escassos (BLUMENTHAL; GOLDBERG; BRINCKMANN, 2000; CARNEIRO et al., 2014).

O extrato aquoso de *E. giganteum* foi utilizado em modelo *in vivo* (camundongos) para testes frente a inflamação aguda e, em conclusão, tem um potencial anti-inflamatório no modelo agudo de inflamação, bem como um efeito imunomodulador nos linfócitos B e T, com uma ação independente da citotoxicidade (FARINON et al., 2013).

Dentro desse contexto, algumas vantagens da utilização de *E. giganteum*, contra a formação de biofilme de *Candida albicans*, foram previamente observadas pela nossa equipe. *E. giganteum* associado ao adesivo protético COREGA® exerceram papel colaborador e inovador, podendo auxiliar de forma temporária no tratamento e ou prevenção da estomatite protética, por atuar sobre o principal agente etiológico desta patologia, o fungo *C. albicans*. Essa associação pode ser uma alternativa, desde que as propriedades inerentes do adesivo sejam mantidas (ALMEIDA, 2015). Também foram observadas propriedades antimicrobianas contra *C. albicans*, *S. aureus* e *Escherichia coli*; ação antiaderente em *C. albicans* sobre a superfície de resina acrílica termopolimerizável; e ação anti-inflamatória sobre monócitos humanos ativados por *C. albicans*. A viabilidade de monócitos humanos e de células epiteliais de palato humano não foi comprometida, demonstrando não apresentar toxicidade sobre essas células. Em estudo realizado simultaneamente a estes achados prévios, o extrato bruto de *E. giganteum* revelou a presença de compostos fenólicos derivados do ácido cafeico e ácido ferúlico, e de heterosídeos

de flavonoides derivados de quercetina, do kaempferol, além de estilpironas (ALAVARCE et al., 2015).

2.3 *Punica granatum*

P. granatum é uma planta da família Punicaceae, cultivada mundialmente em regiões de clima tropical e subtropical, cujo fruto é conhecido como romã. Nativa da região que abrange desde o Irã até o Himalaia, ao noroeste da Índia, esta planta tem sido cultivada por muito tempo por toda a região Mediterrânea da Ásia, África e Europa (LORENZI; SOUZA, 2001; SHEETS; DU BOIS; WILLIAMSON, 2004).

Antes de suas propriedades medicinais serem estudadas, a romã foi considerada sagrada por muitas das principais religiões do mundo. No judaísmo, a romã era reverenciada pela beleza de seus arbustos, flores e frutos, simbolizando santidade, fertilidade e abundância. No budismo, representa a essência das influências favoráveis; no Japão, é recomendada a mulheres inférteis e, na China, é representada na arte cerâmica que simboliza a fertilidade, a abundância e a posteridade. No cristianismo, é o símbolo de ressurreição e vida eterna (LANGLEY, 2000).

Os preparos obtidos da romãzeira (flor, fruto e casca do fruto) são popularmente usados para tratar vários problemas de saúde, principalmente ligados ao sistema gastrointestinal (LANGLEY, 2000). O extrato de *P. granatum* é rico em dois tipos de compostos polifenólicos: as antocianinas, que dão a cor vermelha às frutas e ao suco; e os taninos hidrolisáveis, amplamente relacionados à atividade antimicrobiana desta planta (JURENKA, 2008). Frutos de romã (casca, arilo, sementes e suco) foram relatados como ricos em ácidos fenólicos, flavonoides, flavonas, flavononas, antocianidinas e antocianinas. Os dados da literatura relataram antocianinas glicadas, além dos compostos fenólicos comuns às partes comestíveis, como o ácido gálico nas flores; enquanto que as partes não comestíveis de romã, compreendendo folhas, raízes e caule, continham apigenina, punicalina, punicalagina e luteolina. Esta composição polifenólica rica tem sido intrinsecamente ligada aos efeitos farmacológicos dos extratos de romã. No entanto, deve-se notar

que as fontes de variação no nível de fitoquímicos e nutrientes decorrentes da variabilidade genética de uma planta naturalizada, além de fatores geográficos e ambientais, podem resultar em composições polifenólicas diversas que modulam o nível de bioatividade (RUMMUN et al., 2013).

P. granatum é um potente antioxidante e possui propriedades anti-aterogênicas, anti-hipertensivas e anti-inflamatórias. Pode ser usado na prevenção e tratamento de vários tipos de câncer, doenças cardiovasculares, osteoartrite, artrite reumatóide e outras doenças. Além disso, melhora a cicatrização de feridas e é benéfico para o sistema reprodutor (ZARFESHANY; ASGARY; JAVANMARD, 2014).

O extrato de casca de *P. granatum* também mostrou ter propriedades anti-inflamatórias e analgésicas tópicas, uma vez que atenuou, dependentemente da dose, as respostas inflamatórias em modelos agudos e crônicos de inflamação. Verificou-se que a melhora no índice de sangramento gengival nos grupos de pacientes com gengivite e periodontite crônica, que utilizaram enxaguatório bucal com extrato de *P. granatum*, foi tão significativa quanto aquela observada após uso de camomila e clorexidina 0,12%. O extrato de metanol da casca de *P. granatum* demonstrou atividade antimicrobiana, inibindo o crescimento de certos patógenos envolvidos em infecções orais como *Streptococcus mutans*, *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus salivarius*, *Streptococcus sanguinis*, *Staphylococcus epidermidis*, *Actinomyces viscosus*, *Lactobacillus acidophilus* e *C. albicans* (RAMALINGUM; MAHOMOODALL, 2014).

A combinação dos extratos etanólicos de *P. granatum* e *Eugenia uniflora* foram testados em ensaios *in vitro* e *in vivo* frente a *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923) e *Staphylococcus epidermidis* (ATCC 14990). No sistema *in vitro*, essa combinação mostrou ter um resultado significativo frente as duas cepas. No bioensaio *in vivo* contra *S. epidermidis*, não houve diferença estatisticamente significativa entre o produto testado e os padrões utilizados após cinco minutos de aplicação do produto. Assim, o produto originado pode ser considerado uma fonte alternativa anti-séptica contra *Staphylococcus epidermidis*, comparado com o gluconato de clorexidina (BERNARDO et al., 2015).

Substâncias de *P. granatum* mostraram capacidade antimicrobiana contra células de levedura do gênero *Candida*, com uma Concentração Inibitória Mínima (CIM) em caldo de 125 µg/mL. Os compostos bioativos (taninos) presentes no pericarpo e na casca apresentaram atividade antifúngica. Estes compostos bioativos podem ser responsáveis por mudanças na morfologia celular, inibindo o crescimento, produzindo material viscoso e rompendo as células (ANIBAL et al., 2013).

Em pesquisa realizada pela nossa equipe, *P. granatum* demonstrou ter um potencial antifúngico, fortalecendo a idéia de sua utilização clínica no tratamento e / ou prevenção da estomatite protética. O tratamento da resina termopolimerizável com a associação adesivo COREGA®/ *P. granatum* revelou interferência no desenvolvimento do biofilme de *C. albicans* sobre a superfície dessa resina, minimizando significativamente sua colonização e reduzindo seu metabolismo (ALMEIDA, 2015).

2.4 Cultura celular e citotoxicidade

No princípio do século XX, surgia o princípio científico do cultivo de células por Harrison, em 1907 e Carrel, em 1912. Os primeiros experimentos consistiam em cultivo de tecidos fragmentados mecanicamente em frascos contendo fluido de animais de onde eram retirados os tecidos. Devido a essa forma de cultivo, durante mais de 50 anos essa técnica foi chamada de cultivo de tecidos (*tissue culture*), sendo esse termo atualmente usado genericamente para denominar tanto o cultivo de células quanto o de tecidos e órgãos. Harrison demonstrou a geração de fibras nervosas em explantes de tecido neural de embriões de sapo, cultivados em câmara fechada contendo linfa. Alexis Carrel desenvolveu um modelo a partir de células cardíacas de embrião de galinha para o cultivo e descobriu-se a necessidade da troca de fonte de nutrientes contidos nos frascos. Essa renovação constante de nutrientes permitiu que as células pudessem ser cultivadas por períodos ainda maiores do que os utilizados por Harrison (FRESHNEY, 1987).

Atualmente as culturas de células e também de tecidos estão sendo amplamente utilizadas, principalmente em pesquisa básica aplicada e testes de citotoxicidade de algumas substâncias. Esses ensaios dão suporte para o conhecimento da toxicidade de uma droga ou substância recém-descoberta, em relação às células de nosso organismo. A utilização do cultivo de células como um estudo prévio favorece a redução do número de animais utilizados em pesquisas, principalmente mamíferos, tema que tem trazido discussões acaloradas por parte de ativistas contrários a esta prática em pesquisa (MORALES, 2008).

Os primeiros ensaios a serem executados, quando surge a possibilidade de estudar um novo material, fármaco ou substância, são os testes de citotoxicidade, que estimam a possível alteração nas funções celulares básicas, levando a danos que podem ser avaliados através da detecção de alterações no metabolismo, no comportamento celular e estrutural e nas propriedades essenciais para a sobrevivência da célula, tais como a proliferação celular e a manutenção das suas funções. Os ensaios de citotoxicidade podem apresentar resultados temporais imediatos ou em curto prazo, estando associados, em ambos os casos, com a permeabilidade da membrana celular ou dano específico ao metabolismo da célula. Estes ensaios têm por finalidade quantificar células viáveis expostas a condições traumáticas (FRESHNEY, 1990; BOSS, 2000).

A avaliação da citotoxicidade *in vitro* de alguma substância é, muitas vezes, uma análise qualitativa com base na morfologia da lesão celular causada ou na proliferação da célula em questão, após contato direto ou indireto com o material ou fármaco. Em geral, os métodos envolvem a medição da proliferação celular (contagem de células ou avaliação de confluência). Estes métodos são mais sensíveis e seletivos do que aqueles em que o material teste é colocado diretamente na cultura celular para determinar a zona de inibição de crescimento (JOHNSON et al., 1983).

Atualmente, estão disponíveis comercialmente uma ampla variedade de testes para avaliar a citotoxicidade. Estes incluem diferentes tipos de linhagens celulares, tais como a cultura de fibroblastos de pele humana, mucosa bucal, membrana periodontal, células embrionárias de pulmão, células epiteliais, culturas de queratinócitos humanos, linfócitos T a partir de nódulos linfáticos e macrófagos

obtidos por lavagem peritoneal. Todas estas células são adequadas para ensaios de biocompatibilidade. No entanto, a opinião geral é que os testes de toxicidade *in vitro* são mais convincentes quando realizados com células que são homólogas ao tecido humano. De acordo com esta afirmação, as linhagens celulares mais adequadas para utilização de testes de citotoxicidade e de tolerância aos fármacos, direcionados a pele e mucosas, são os fibroblastos humanos e queratinócitos epidérmicos humanos (GENERICS, 2011).

Os fibroblastos são localizados no tecido conjuntivo subjacente ao epitélio. A sua principal função é a manutenção da integridade estrutural através da secreção contínua de macromoléculas da matriz extracelular (colágeno, glicanos glicosamina e glicoproteínas). Qualquer tipo de dano tecidual, estimula a proliferação de fibroblastos e induz a liberação de citocinas. Para fins experimentais, os fibroblastos podem ser isolados a partir de biópsias de pele ou mucosas por meio de digestão enzimática da derme ou por método de explante (WIEGAND; HIPLER, 2008).

Esta célula, por sintetizar uma matriz extracelular rica em colágeno, mantém o quadro estrutural (estroma) para diversos tecidos (WIEGAND, HIPLER 2008). Fibroblastos têm uma aparência morfolologicamente heterogênea de acordo com a sua localização e atividade diversificada. Por exemplo, no coração, os fibroblastos desempenham um papel importante no reforço da rigidez intrínseca do miocárdio, o que pode resultar, em algumas situações, na disfunção diastólica (DE MELLO, 2004; MEHTA; GRIENDLING, 2007; SEDDON; LOOI; SHAH, 2007; HOIT, 2007), bem como na fibrose intersticial com aumento da deposição das proteínas da matriz extracelular (MEHTA; GRIENDLING, 2007; SEDDON; LOOI; SHAH, 2007; LEASK, 2007). No pulmão, a proliferação de fibroblastos desempenha uma função importante na fase tardia da lesão pulmonar aguda (MANSON, 1997). Além disso, os fibroblastos desempenham um papel importante na cicatrização de feridas (GENERICS, 2011).

Para uma cultura celular primária, os fibroblastos são adquiridos a partir de fragmentos de tecido conjuntivo, por desagregação enzimática ou mecânica, e mantidos em meios de cultura suplementados com soro. Nestes sistemas, proliferam-se rapidamente e tornam-se o tipo celular predominante. Após algumas

passagens, geralmente apenas os fibroblastos são as células proliferativas sobreviventes. Uma das razões é que a maioria dos meios de cultura disponíveis otimiza e favorece as linhagens celulares fibroblásticas (SATO et al., 1994).

Muitos são os ensaios disponíveis para avaliar a viabilidade das células, a maioria deles colorimétricos, como o Azul de Tripan; Vermelho Neutro; Brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-yl)-2,5-difeniltetrazólio (MTT); (2,3 Bis (2-Methoxy-4-Nitro-5-Sulfophenil) – 5 - [(Phenyl-Amino) Carbonyl] – 2H - Tetrazolium Hidroxide) (XTT); Cristal violeta e kit LIVE/DEAD® com microscopia de fluorescência. Tais ensaios são amplamente utilizados e podem oferecer grande vantagem na avaliação, uma vez que permitem uma rápida medição da inibição do crescimento celular testado. A escolha de um ensaio sobre outro depende de uma ampla gama de considerações, incluindo as limitações de cada teste, facilidade e rapidez de utilização, recursos disponíveis e complexidade dos equipamentos (HAWKINS; ABRAHAMSE, 2005; STODDART, 2011).

A identificação de células viáveis pelo corante Azul de Tripan baseia-se na ruptura da integridade da membrana, determinada pela entrada de um corante, ao qual as células viáveis são geralmente impermeáveis. Por outro lado, Vermelho neutro é um corante normalmente retido por células viáveis. Entretanto, estes efeitos são imediatos e não preveem a sobrevivência posterior das células testadas (FRESHNEY, 2005). O teste a base de Cristal Violeta é responsável por corar os ácidos nucleicos das células (KUENG; SILBER; EPPENBERGER, 1989).

Desde o seu desenvolvimento por Mosmann em 1983, o ensaio MTT tornou-se o padrão ouro para a determinação da viabilidade celular e da proliferação. Este ensaio mede a viabilidade celular em termos de atividade redutora, por meio da conversão enzimática do composto de tetrazólio em cristais de formazan insolúveis em água. Esta conversão ocorre pelas desidrogenases, presentes nas mitocôndrias das células vivas, embora os agentes redutores e as enzimas localizados em outras organelas, como o retículo endoplasmático, também estejam envolvidos. Na literatura, foram revelados vários ensaios baseados em tetrazólio, tal como o MTT, mostrando que podem ocorrer interações com muitos fitoquímicos, demonstrando potencial redutor intrínseco, incluindo antioxidantes e polifenóis. A taxa de conversão para o formazan está ligada à atividade metabólica

da célula, e a diminuição das concentrações intracelulares de glicose pode resultar numa diminuição da quantidade de cristais de formazan produzidos. Outro fator que influencia a conversão para formazan é o número de mitocôndrias presentes na célula. Consequentemente, as células maiores com mais mitocôndrias têm uma taxa maior de conversão de tetrazólio. Mitocôndrias defeituosas também estão relacionadas com redução de tetrazólio. Tomados em conjunto, esses fatores podem levar a uma falsa estimativa do número de células (JABBAR et al., 1989; SIEUWERT et al., 1995; HAYON et al., 2003; TONDER; JOUBERT; CROMRTY, 2015).

Sob várias condições para a avaliação da viabilidade de diferentes organismos, incluindo células de mamíferos, bactérias e fungos, o ensaio XTT tem sido muito utilizado. O fato de ser simples, rápido e não necessitar de equipamento altamente especializado além de um espectrofotômetro, deve explicar o motivo da sua grande utilização. No entanto, é confiável e preciso apenas se houver uma relação linear entre a atividade metabólica celular (ou número de células) e o sinal colorimétrico. Assim, para que o ensaio seja quantitativo, é importante otimizar vários parâmetros experimentais chave, como número de células, concentração de XTT, tipo e concentração de agente de acoplamento de elétrons, para cada organismo e cada condição experimental (XIE et al., 2011).

A coloração de células através do Kit LIVE/DEAD® consiste na combinação de dois compostos, calceína e homodímero de etídio. Estes compostos variam entre si na sua capacidade de penetrar nas membranas celulares e também nas suas características de espectro. A calceína penetra nas membranas celulares e cora todas as células com membrana intacta ou danificada, em verde fluorescente. O homodímero de etídio consegue penetrar apenas nas células com membrana danificada e sua redução atribui às células com membranas danificadas uma coloração vermelha fluorescente, extinguindo a fluorescência da calceína. Assim, as células com membranas comprometidas coram-se de vermelho e as com membrana íntegra, de verde (BOULOS et al., 1999).

Em um estudo realizado para determinar padrões cinéticos do biofilme de *Pseudomonas fluorescens*, comparando o valor de células totais (mortas e vivas) coradas pelo método DAPI (dicloridrato de 4',6-diamidino-2-fenilindol) e pelo kit LIVE/DEAD®, verificou-se que o valor obtido pelo DAPI foi consideravelmente

superior ao obtido após uso do kit comercial LIVE/DEAD®. Normalmente, o erro é constante ao longo do ensaio, aumentando nos ensaios com maior valor de células totais (RAMOS, 2008). Esta discrepância entre os valores obtidos para cada uma das técnicas foi também mencionada em outros estudos, os quais apresentaram, como justificativa, um número inferior de células totais detectadas pelo kit LIVE/DEAD® em relação ao DAPI. A utilização deste kit está associada com uma diminuição da sua eficiência quando as células da amostra se encontram sob estresse ambiental. Nesse caso, a amostra parece ficar mais susceptível à luz, do que o corante DAPI, o que leva à sua mais rápida perda de fluorescência, contribuindo para a discrepância entre os resultados (BOULOS et al., 1999).

Os ensaios que utilizam a fluorescência, como o kit LIVE/DEAD®, determinam a viabilidade de células individuais por contagem de um ponto de sinal de luz em vez de um sinal homogêneo, o qual representa uma população de células, como por exemplo na citometria de fluxo. Este sinal de ponto de luz é mais variável do que os ensaios que quantificam a viabilidade de toda a população de células. Entretanto, a avaliação da viabilidade celular em placa de 96 poços, como utilizado em citometria de fluxo, é demorada e requer a contabilização de grandes populações de células vivas ou mortas dentro de um tempo relativamente curto, sendo difícil evitar a morte celular durante o processo de contagem. No método via o kit LIVE/DEAD®, as células podem ser fotografadas para posterior análise (AUTY et al., 2001).

A medida que existe um crescente interesse da utilização de plantas medicinais para o tratamento em diversas áreas de saúde, é fundamental o estudo dessas plantas a fim de adquirir conhecimento sobre suas propriedades ativas e efeitos adversos, evitando efeitos nocivos após sua utilização. Sendo assim, se torna necessário analisar os efeitos tóxicos de plantas medicinais antimicrobianas sobre células humanas, a fim de assegurar a utilização terapêutica.

3 PROPOSIÇÃO

3 PROPOSIÇÃO

Esse trabalho teve como objetivo avaliar se as plantas, *Equisetum giganteum* e *Punica granatum*, alteram a viabilidade de fibroblastos gengivais humanos (FGH).

3.1 Objetivos específicos:

- ✓ Identificar, pelo estudo fitoquímico, as substâncias potencialmente ativas dos extratos brutos de *E. giganteum* e de *P. granatum*, bem como de suas frações diclorometano (**CH₂Cl₂**) e acetato de etila (**AcOEt**) respectivamente;
 - ✓ Quantificar e analisar a viabilidade dos FGH frente a diferentes concentrações dos extratos brutos e das frações acima mencionadas de *E. giganteum* e de *P. granatum*.
-
-

4 MATERIAL E MÉTODOS

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Coleta do material vegetal

A coleta de *Equisetum giganteum* foi realizada em novembro de 2014 no Jardim Botânico Municipal de Bauru, localizado às margens da rodovia Comandante João Ribeiro de Barros - SP 225 (22°20'30" S e 49°00'30" W). Dois ramos férteis da planta foram utilizados para a confecção de exsicatas (identificação e herborização) e incluídos no acervo do Herbário da UNESP de Bauru (UNBA 5795). Assim como para *Punica granatum*, o material coletado foi processado e analisado fitoquimicamente no Laboratório de Química de Produtos Naturais – UNESP/BAURU, sob coordenação da Profa. Dra. Anne Lígia Dokkedal. Foram obtidos 8 kg de material fresco (partes aéreas) (**Figura 1A**), os quais foram submetidos à secagem em estufa de circulação de ar (MA035/1 - Estufa de Secagem com Renovação/Circulação de Ar, Marconi®, Piracicaba, SP, Brazil), a 45°C, até a secagem completa. Em seguida, o material seco (2,9 Kg) foi pulverizado em moinho de facas (MA048 - Moinho Micro de Facas, Marconi®, Piracicaba, SP, Brazil). A extração foi feita por percolação do pó (500g) obtido das partes aéreas da planta com etanol 70% (EtOH: H₂O 7:3).

Os frutos de *P. granatum* foram obtidos no Supermercado Super Bom Premium (Av. Orlando Ranieri, 6-20 - Jardim Marambá; Cep: 17030-671 Bauru/SP, Fone: (14) 3201-3201), pelo Distribuidor de Frutas e Mudas Boa Fruta (Rua Padre Anchieta, 186; Cep: 56300-000 Petrolina/PE Fone (87) 3861-4615).

De acordo com o produtor e agrônomo Paulo Sérgio de Carlos Nogueira, responsável por este cultivar, os frutos utilizados em nosso trabalho apresentaram-se com coloração suavemente avermelhada, possuem sementes comestíveis e flores com sépalas curtas. A seleção dos genes foi feita por meio da clonagem (propagação vegetativa) de quatro mudas a partir da planta matriz por estaquia, utilizando as sementes viáveis para a produção em escala. O cultivo é feito em Petrolina, PE, Brasil (Pararelo 9/Longitude 24°), a poda é realizada bimestralmente por escalonamento e a irrigação é fornecida para o lote por gotejamento. Quando os

frutos alcançam tamanho razoável para serem comercializados, é realizada a colheita, os frutos viáveis são separados em lotes, lavados, embalados e armazenados em caixas devidamente lacradas para posterior transporte e distribuição em seus respectivos destinos.

Foram obtidos 2 Kg de material fresco para triagem das cascas do fruto (920g) (**Figura 1B**), as quais foram submetidas à secagem completa em estufa de circulação de ar, a 45°C (**Figura 1C**). Em seguida, as cascas foram pulverizadas em moinho de facas (**Figura 1D**), a fim de facilitar a extração de seus constituintes químicos, sendo posteriormente pesadas, embaladas, etiquetadas e armazenadas em local seco e escuro.

4.2 Obtenção dos extratos brutos (EB Et OH 70%)

O **EB EtOH 70%** hidroalcoólico das partes aéreas de *E. giganteum* foi obtido através de extração por percolação, um processo dinâmico onde se faz o arrastamento dos compostos presentes na planta em pequenas quantidades ou pouco solúveis, pela passagem contínua do líquido extrator, levando ao esgotamento através do gotejamento do material (PRISTA, 1995).

Para obtenção deste extrato, o material seco e triturado (400g) foi previamente intumescido com 2L de EtOH: H₂O 7:3 durante 2h em béquer. Após esse período, o percolador foi empacotado com a mistura (pó + EtOH 70%), sendo o empacotamento feito da forma mais homogênea possível, evitando a formação de bolhas ou buracos no conteúdo alocado dentro do percolador. A altura do enchimento obedeceu à proporção 5:1 (referente ao volume do percolador e do material vegetal) em relação ao tamanho do percolador (**Figura 1E**). A vazão do percolador ficou entre 1-2,0 mL.min⁻¹Kg de material vegetal.

Após extração exaustiva, a solução foi concentrada em rotaevaporador (Modelo Banho Maria Heizbad-VAP, Heidolph®, Schwabach, Germany) sob pressão reduzida em temperatura inferior a 50°C, para a remoção do solvente orgânico (**Figura 1F**). Após a remoção do solvente, o **EB EtOH 70%** proveniente das partes aéreas de *E. giganteum* foi liofilizado, obtendo 41g (8,3%).

A obtenção do **EB EtOH 70%** hidroalcoólico das cascas de *P. granatum*, em sua forma pó, foi também realizada por meio da percolação obtendo 52g (13%), como descrito anteriormente (**Figura 1**).

Figura 1. A) Partes aéreas de *E. giganteum*; B) Cascas de *P. granatum*; C) Estufa de secagem; D) Moinho de facas; E) Percolador; F) Rotaevaporador.

4.3 Obtenção de frações de *E. giganteum* e *P. granatum* por Extração Líquido-Líquido (ELL)

A Extração Líquido-Líquido (ELL), conhecida como extração por solvente ou partição, é um método utilizado para separar componentes específicos de uma mistura de líquidos baseado em suas diferentes solubilidades (polaridades). Assim, são obtidos dois líquidos distintos e imiscíveis, geralmente água e um solvente orgânico adequado, visando fracionar os principais metabólitos secundários

produzidos pelas plantas. Sendo assim, o soluto mais polar dissolve, preferencialmente, no solvente mais polar.

A partir da obtenção dos **EB EtOH 70%** de *E. giganteum* (partes aéreas) e de *P. granatum* (cascas), os materiais vegetais foram submetidos à ELL com diferentes solventes orgânicos contra fase aquosa. Para isso, uma alíquota de 2g do **EB EtOH 70%** de ambas as plantas foi dissolvida em 500 mL de água deionizada, com o auxílio de um ultrasson (Ultrasonic Cleaner 1440D, Odontobrás[®], Ribeirão Preto, SP, Brazil); o extrato então foi despejado em funil de separação (MOD94294 - Funil de Separação Squibb Torneira de Vidro e Rolha de Polipropileno, Laborglas[®], Belenzinho, SP, Brazil). Posteriormente, 500 mL do solvente orgânico foram adicionados. Após agitação manual, o funil foi deixado “overnight” para a separação completa dos componentes que possuísssem afinidade pelo determinado solvente. Este procedimento foi repetido duas vezes para cada passagem de solvente.

Para *E. giganteum*, foram utilizados diclorometano (**CH₂Cl₂**), e acetato de etila (**AcOEt**) e *n*-butanol (***n*-BuOH**) (ALAVARCE, 2015) na proporção 1:1; e para *P. granatum*, foram utilizados **AcOEt** e ***n*-BuOH** (1:1) (ENDO et al., 2010). Como utilizamos as cascas dos frutos, não houve a necessidade da utilização de um solvente orgânico clorado para *P. granatum*.

Após o período de 48h, foi possível observar a separação completa da fase aquosa (**H₂O**) dos demais solventes orgânicos utilizados; então as frações de cada planta eram esgotadas, suavemente, para um béquer e concentradas em rotaevaporador, para a retirada completa do solvente. Sendo assim, a fração purificada foi liofilizada, facilitando assim o manuseio nos demais protocolos.

As **Figuras 2 e 3** demonstram as etapas realizadas para a obtenção do **EB EtOH 70%** e suas frações por ELL, de *E. giganteum* e *P. granatum*, respectivamente, por percolação.

Figura 2. Procedimentos envolvidos na obtenção do **EB EtOH 70%** e das frações (**CH₂Cl₂**, **AcOEt** e **n-BuOH**) por Extração Líquido-Líquido (ELL) de *E. giganteum* (fonte: SALDANHA L L. Prospecção química e avaliação das atividades antioxidante e alelopática de *Myrcia bella* Cambess. [Mestrado]. Botucatu: Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, Instituto de Biociências de Botucatu; 2013).

Figura 3. Procedimentos envolvidos na obtenção do **EB EtOH 70%** e das frações (**AcOEt** e **n-BuOH**) por Extração Líquido-Líquido (ELL) de *P. granatum* (fonte: SALDANHA L L. Prospecção química e avaliação das atividades antioxidante e alelopática de *Myrcia bella* Cambess. [Mestrado]. Botucatu: Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, Instituto de Biociências de Botucatu; 2013).

4.4 Seleção das frações de *E. giganteum* e *P. granatum*

A fim de determinar a concentração inibitória mínima (CIM) das diferentes frações obtidas por ELL, as mesmas foram submetidas à contagem de unidades formadoras de colônias (UFC) de *Candida albicans* SC5314, gentilmente cedida pelo Dr. Arnaldo Lopes Colombo, diretor técnico do Laboratório Especial de Micologia, da

Universidade Federal de São Paulo, e manipulada nas dependências do Centro Integrado de Pesquisa (CIP), da FOB – USP. O preparo do inóculo foi feito da seguinte maneira: as células mantidas a - 80°C foram reativadas da sua cultura original em solução contendo 20% de glicerol (CATALÁN et al., 2008), semeadas em placas contendo 20 mL de meio de cultura YEPD (Yeast Extract Peptone – Dextrose Broth, Sigma Aldrich®) e incubadas a 37°C, durante 48 h, em condições aeróbias em estufa bacteriológica (Mod. MA 033, Marconi®) (ULUDAMAR; OZYESIL; OZCAN, 2008; DA SILVA, 2011).

Após o período de incubação, uma única colônia de *C. albicans* foi removida, ressuspensa em 50 mL de meio de cultura YEPD e mantida na incubadora com agitação orbital a 30°C, sob agitação 180 rpm *overnight* (aproximadamente 16 h), resultando em uma pré-cultura (EUROPEAN COMMITTEE FOR ANTIMICROBIAL SUSCEPTIBILITY TESTING OF THE EUROPEAN SOCIETY OF CLINICAL INFECTIOUS, 2000; RAMAGE et al., 2001). Uma alíquota de 5 mL da cultura foi retirada e colocada em tubos de 15 mL (TPP® 91015 - Techno Plastic Products) para centrifugação a 4000 rotações por minuto por cinco minutos, para separação dos microrganismos do sobrenadante; em seguida, o sobrenadante foi desprezado.

A purificação das células foi feita através de lavagem do precipitado com 5 mL de PBS (Phosphate Buffer Solution, Sigma Aldrich® Inc.) e homogeneização em vórtex (Agitador de Tubos Tipo Vortex Mod. QL-901, Biomixer), seguida de nova centrifugação nas mesmas condições descritas anteriormente, desprezando o sobrenadante. Esse procedimento foi repetido duas vezes (RAMAGE et al., 2001).

O precipitado final, obtido após o processo de purificação das células, foi ressuspensa em 1 mL de PBS e diluído a 1:10000. Uma alíquota da diluição (10 µL) foi colocada em câmara de Neubauer para contagem de leveduras em microscópio óptico comum (DM4 M, Leica Microsystems, Ltda®) (BIZERRA et al., 2008). Depois de obtida a concentração final da suspensão, esta foi diluída em PBS para aquisição de inóculo em concentração de 1×10^7 células/mL (CHANDRA et al., 2001b; PAVAN et al., 2010).

Como controle, poços receberam apenas o meio de cultura TBS

(Trypticase Soy Broth – Sigma Aldrich® Inc.) a fim de comparar o crescimento do fungo sobre a presença das diferentes frações. Por fim, as placas foram mantidas em incubadora com agitação orbital (Shaker – Mod 430/ RDPB, Nova Ética®), a 37°C durante 24 h.

Segundo o protocolo desenvolvido pela nossa equipe de pesquisa, 10, 20, 30, e 50 mg de cada fração das duas plantas foram colocados em microtubos de 2 mL (Eppendorf®) contendo 50 µL (5%) de DMSO (Dimetilsulfóxido – Sigma Aldrich® Inc.) e 950 µL de meio de cultura TSB para diluição. Depois de diluídas, essas frações foram distribuídas em placas de 24 poços (TPP® - Techno Plastic Products) e homogeneizadas com 1 mL do inóculo de *C. albicans*, previamente padronizada como na descrição acima.

Após esse período, 1 mL/poço foi coletado para se obter diluições seriadas em PBS, ou seja 10^{-1} a 10^{-4} . A diluição ideal para a contagem das UFCs foi 10^{-4} ; portanto alíquotas de 50 µL dessa diluição foram plaqueadas, em duplicata, em placas de Petri contendo ágar Sabouraud Dextrose (Difco®), com cloranfenicol. As placas foram mantidas em estufa a 37°C e após 24 h, as colônias do gênero *Candida* foram quantificadas visualmente. Para esse procedimento, foram realizados três experimentos independentes.

Por fim, as frações que apresentaram melhor atividade antifúngica contra *C. albicans*, foram diclorometano (**CH₂Cl₂**) para *E. giganteum* e acetato de etila (**AcOEt**) para *P. granatum*. Considerando esses resultados, essas foram as frações selecionadas para os experimentos de viabilidade celular.

4.5 Identificação dos compostos por HPLC – PAD

Para a triagem cromatográfica por HPLC – PAD (*High Performance Liquid Chromatography – Photodiode Array Detector* - Cromatografia Líquida de Alta Eficiência acoplada com Detector de Arranjo de Fotodiodos), uma alíquota de 10 mg do extrato bruto e das frações selecionadas de *E. giganteum* e de *P. granatum* foram solubilizadas em MeOH:H₂O (1:1,v/v) e filtradas em filtro de seringa com membrana de politetrafluoroetileno com poros de 0,45 µm. As separações cromatográficas

foram realizadas com uma coluna de sílica de fase reversa Phenomenex® (C18) (250 x 4,6 mm di.5 µm). Como fase móvel, utilizaram-se os solventes MeOH + Ácido Fórmico 0,1% (**A**) e H₂O + Ácido Fórmico 0,1% (**B**) e um gradiente exploratório de 5-100% de **A** em **B**, em 60 minutos. Os cromatogramas foram monitorados em 254 nm e 360 nm (SALDANHA, 2013).

4.6 Cultivo dos fibroblastos gengivais humanos (FGH)

Alíquotas de FGH congeladas em nitrogênio líquido, no laboratório de Bioquímica da FOB/USP, foram gentilmente cedidos pela Prof. Dra. Carla Andreotti Damante, do Departamento de Prótese e Periodontia da referida faculdade. Estas células foram utilizadas para viabilizar o projeto de pesquisa intitulado “**Comportamento de células do periodonto na reparação de feridas**”, o qual teve aprovação pelo Comitê de ética da FOB-USP (CAAE: 21624113.5.0000.5417). As células foram obtidas da mucosa de palato duro, a partir de amostras teciduais cirúrgicas, as quais foram separadas por meio do método explante e, posteriormente, congeladas em nitrogênio líquido.

4.6.1 Descongelamento

O tubo criogênico (TAP®) contendo as células congeladas foi levado ao banho maria a 37°C (FANEM®) até o descongelamento do seu conteúdo. As células descongeladas foram transferidas para um tubo Falcon de 15 mL (SPL Lifesciences®) com 10 mL de meio de cultura Eagle modificado por Dullbeco – DMEM (GIBCO®), com 10% de soro fetal bovino (HyClone®), suplementado com 1% de estreptomicina. Esse tubo foi centrifugado (Centrifuga eppendorf®– 5804 R) a 1000 rotações por minutos durante cinco minutos a 24°C. Após esse período, o sobrenadante foi descartado, permanecendo apenas o *pellet* (precipitado celular), o qual foi ressuspensionado em 1 mL de meio de cultura. Essas células foram transferidas para um frasco de cultura de 75 cm³ - 270 mL (Corning®), contendo 10 mL de meio de cultura. Após observação em microscópio invertido (Olympus® CKX41) para a verificação da presença das células, o frasco de cultura foi mantido em estufa a 37°C

(Modelo Ultra Safe® HF 212 UV) numa atmosfera úmida contendo 95% de ar e 5% de CO₂.

4.6.2 Subcultivo e expansão dos FGH

A monitorização do crescimento celular foi feita a cada 24 h, utilizando-se microscópio invertido de fase. O meio de cultura foi trocado a cada 48 h, para a remoção de células mortas e nutrição de células vivas.

Os FGH cresceram em monocamada de aderência e, após a subconfluência dessa monocamada celular, foram realizados os subcultivos. Quando os FGH atingiram essa subconfluência, ou seja cerca de 80% do frasco de cultura, o meio de cultura foi descartado e os FGH lavados com 5 mL de PBS por três vezes. Em seguida, foram acrescentados, no frasco de cultura, 3mL de solução de tripsina 0,25% (HyClone®), uma enzima proteolítica que tem como objetivo digerir as adesões célula-célula e dissociar as células dos frascos de cultura. O frasco contendo a tripsina foi mantido em estufa úmida a 37°C por um minuto. Na sequência, leves batidas em seu fundo foram aplicadas para auxiliar a remoção celular.

Ao constatar que os FGH não estavam mais aderidos ao fundo do frasco de cultura, foram pipetados 6 mL de meio de cultura para a inativação da tripsina. A solução foi então transferida para um tubo Falcon de 15 mL e centrifugada a 1000 rpm por cinco minutos a temperatura de 24°C. O sobrenadante foi descartado e o *pellet* foi ressuspendido em 1 mL de meio. Após a homogeneização, os FGH foram distribuídos em dois ou mais frascos de cultura contendo em cada um 10 mL de meio de cultura. Tais frascos foram mantidos em estufa úmida a 37°C, onde permaneceram até a troca dos meios e um novo subcultivo. Foram realizados subcultivos até se atingir uma quantidade necessária de células para a realização dos experimentos.

4.6.3 Quantificação dos FGH

Foi realizada a quantificação direta dos FGH para definir a viabilidade

celular e as condições de crescimento. Para essa quantificação, primeiramente foi utilizado o mesmo protocolo do subcultivo de obtenção do *pellet*, para que as células ficassem totalmente individualizadas. Após esse processo e a ressuspensão do *pellet*, foi feita uma diluição de 1:10 (*pellet*:meio) e uma alíquota da diluição de 10 μL foi colocada em câmara de Neubauer para a quantificação dos FGH em microscópio óptico comum (DM4 M, Leica Microsystems, Ltda®, São Paulo, SP, Brazil). Depois de obtida a concentração final da suspensão, essa foi diluída em meio, para a aquisição de 1×10^4 células por poço, para uma placa de 96 poços.

4.7 Preparo das concentrações de *E. giganteum* e de *P. granatum*

Conforme normativa ISO nº 10993-5, para teste *in vitro*, testes com diferentes diluições devem ser realizados, a fim de tentar cobrir o intervalo de concentrações (entre 10% e 90% de efeito) com pelo menos três pontos de um efeito graduado, evitando muitas concentrações não citotóxicas e muitas concentrações citotóxicas. Portanto, foi escolhida a concentração de 30 mg/mL como sendo a diluição inicial para os extratos brutos e frações (**Figura 4**).

Figura 4. Demonstrativo da diluição em série utilizada para as preparações das concentrações de extratos brutos e das frações.

Foram pesados separadamente 30 mg dos extratos brutos e das frações liofilizados de *E. giganteum* e de *P. granatum*, os quais foram diluídos em 1 mL de meio DMEM com 10% de SFB. Em seguida, diluições seriadas foram feitas a partir da solução inicial de 30 mg/mL de cada planta. As diluições eram feitas no dia dos tratamentos e utilizadas imediatamente após a sua realização.

4.8 Grupos experimentais

Neste trabalho, foi avaliada a citotoxicidade do **EB EtOH 70%** de *E. giganteum* e de *P. granatum*, bem como de suas frações diclorometano (**CH₂Cl₂**) e acetato de etila (**AcOEt**), respectivamente.

Portanto, para o **EB EtOH 70%** das plantas, as seguintes concentrações (mg/mL) foram preparadas; 30, 15, 7.5, 3.75, 1.88, 0.94, 0.47 e 0.23. Os grupos experimentais foram então denominados de acordo com a concentração e a planta (E para *E. giganteum* e P para *P. granatum*):

E 30, E 15, E 7.5, E 3.75, E 1.88, E 0.94, E 0.47 e E 0.23;

P 30, P 15, P 7.5, P 3.75, P 1.88, P 0.94, P 0.47 e P 0.23.

Da mesma forma, os grupos experimentais referentes às frações **CH₂Cl₂** do *E. giganteum* e **AcOEt** de *P. granatum* foram assim denominados:

CH 30, CH 15, CH 7.5, CH 3.75, CH 1.88, CH 0.94, CH 0.47 e CH 0.23;

Ac 30, Ac 15, Ac 7.5, Ac 3.75, Ac 1.88, Ac 0.94, Ac 0.47 e Ac 0.23.

A nomenclatura de todos grupos experimentais está na **Tabela 1**.

Tabela 1. Nomenclatura dos grupos experimentais, considerando a concentração e a planta

Extrato ou fração	Concentração em mg/mL							
	0.23	0.47	0.93	1.88	3.75	7.5	15	30
<i>E.giganteum</i> (EB EtOH70%)	E 0.23	E 0.47	E 0.93	E 1.88	E 3.75	E 7.5	E 15	E 30
<i>P.granatum</i> (EB EtOH70%)	P 0.23	P 0.47	P 0.93	P 1.88	P 3.75	P 7.5	P 15	P 30
<i>E.giganteum</i> (CH ₂ Cl ₂)	CH 0.23	CH .47	CH 0.93	CH 1.88	CH 3.75	CH 7.5	CH 15	CH 30
<i>P.granatum</i> (AcOt)	Ac 0.23	Ac 0.47	Ac 0.93	Ac 1.88	Ac 3.75	Ac 7.5	Ac 15	Ac 30

4.9 Ensaio de viabilidade celular

A viabilidade celular foi avaliada através do kit comercial LIVE/DEAD® (Viability/Cytotoxicity Kit, L-3224), que se baseia na determinação simultânea de células vivas e mortas por fluorescência. A calceína marca células vivas pela cor verde e o homodímero de etídio marca células mortas pela cor vermelha. Foram feitas leituras das unidades relativas de fluorescência (URF) do conteúdo dos poços das placas, e a captura de fotos em microscópio invertido de fluorescência (LEICA® DM IRBE).

Em placas de 96 poços, foram pipetados 30 µL de solução das diferentes concentrações dos extratos brutos e das frações de *E. giganteum* e *P. granatum*. Como controles, poços foram acrescidos de 200 µL de metanol para que se induzisse a morte e fixação dos FGH aderidos, enquanto outros poços receberam apenas o meio de cultura.

As placas foram condicionadas em estufa úmida 37°C, por 3 h para a impregnação dessas soluções nos poços. Após esse período, o excesso das soluções foi retirado com o auxílio de micropipeta, e a placa foi colocada novamente na estufa úmida por 30 minutos para que as soluções ficassem totalmente secas. Em seguida, foram semeados 200µL de DMEM completo com 1 x 10⁴ células/poço, e as placas foram mantidas em estufa úmida por 12, 24, 36 e 60 h. Após cada período, as placas foram retiradas da estufa e descartados os sobrenadantes de

cada poço.

Em seguida, cada poço recebeu 50 µL da solução de fluorescência contendo PBS, calceína 2 µM e homodímero de etídio 4 µM na proporção de 1 mL/1 µL/2 µL foram adicionados em cada poço.

A viabilidade celular foi analisada por meio de leitura das UFR do conteúdo dos poços, utilizando um espectrofotômetro (Synergy Mx Monochromator-Based Biotek®) sob o comprimento de onda de 485/530nm (excitação/leitura) para a calceína e 530/645nm (excitação/leitura) para o homodímero de etídio.

Os FGH foram observados em microscópio invertido de fluorescência (LEICA® DM IRBE) e microfotografias foram capturadas em câmara de vídeo digital (Leica® DFC310 FX) na objetiva de 10x. Os FGH são células de aderência, portanto, estão aderidas quando vivos e perdem essa aderência quando mortos. Assim, após os períodos analisados, os FGH que não estavam vivos encontravam-se no sobrenadante dos poços, e estes foram retirados para acrescentarmos a solução de fluorescência. Por esta razão, somente as células vivas foram representadas nas fotos.

Foram realizados 3 experimentos independentes para cada período de avaliação (12, 24, 36, 60 h), e em cada experimento foram utilizadas triplicatas de cada concentração e dos controles. As porcentagens de viabilidade dos FGH, na presença das diferentes concentrações do extrato bruto ou das frações, foram calculadas a partir da leitura quantitativa das URF obtidas nos poços sem o tratamento (só com meio de cultura - representando 100% de células vivas) comparada à leitura das URF dos poços de cada concentração, de acordo com a seguinte fórmula:

$$\% \text{ de viabilidade} = \frac{\text{URF (concentração testada)} \times 100}{\text{URF (meio)}}$$

4.10 Análise dos resultados

Segundo o padrão internacional da ISO nº 10993-5 para testes quantitativos *in vitro*, resultados com redução na viabilidade celular maior que 30% devem ser considerados positivos para citotoxicidade. Embasando-se nessa afirmação, foi realizada uma análise descritiva dos resultados.

Os resultados quantitativos paramétricos foram representados como média e desvio padrão (SD) com análise de Variância ANOVA- One-Way, seguida da análise comparativa pelo teste de Tukey HSD. Os resultados quantitativos não paramétricos foram apresentados como mediana e quartis e foram submetidos ao teste de Kruskal-Wallis, seguido de análise comparativa pelo teste de Dunn, de acordo com as análises de normalidade (Teste de Kolmogorov-Smirnov). Valores de $p < 0.05$ foram indicativos de significância estatística.

5 RESULTADOS

5 RESULTADOS

5.1 Estudo fitoquímico das substâncias ativas de *Equisetum giganteum* e *Punica granatum*

Os estudos fitoquímicos abrangem a pesquisa de vegetais, para identificar os constituintes químicos das plantas ou o grupo de metabólitos secundários relevantes das mesmas. Portanto, nesse trabalho foi realizada a identificação dos constituintes das partes aéreas de *E. giganteum* e das cascas de *P. granatum* por meio da triagem cromatográfica por HPLC- PAD (High performance Liquid Chromatography – Photodiode Array Detector – Cromatografia Líquida de Alta Eficiência acoplada com Detector de Arranjo de Fotodiodos).

5.1.1 *E. giganteum*

O *screening* por HPLC-PAD do **EB EtOH 70%** e das frações (**CH₂Cl₂, AcOEt, *n*-BuOH e H₂O**), resultante da percolação das partes aéreas de *E. giganteum*, revelou 16 compostos (**Tabela 2**), por meio da combinação da interpretação do tempo de retenção e dos espectros na região do UV para os picos obtidos através do detector de fotodiodos (PAD), realizando varredura na faixa espectral de 200 a 600 nm.

Tabela 2. Compostos identificados a partir das partes aéreas de *E. giganteum* por HPLC-PAD. A sigla **n.i.** representa compostos não identificados.

Picos	Possível Composto	Tempo De Retenção (Min)	λ máx
1	n.i.	2,43	296
2	n.i.	4,04	296
3	n.i.	5,77	260,296
4	Derivado de Kaempferol	7,05	266,344
5	n.i.	7,19	266,344
6	n.i.	7,23	284,308
7	n.i.	7,55	290,314
8	n.i.	8,65	254,332
9	n.i.	9,84	296
10	n.i.	10,16	296
11	Derivado de quercetina	10,36	302,326
12	Derivado de Kaempferol	13,45	266,344
13	n.i.	18,17	260,344,386
14	n.i.	18,69	326
15	Equisetumpirona	24,96	272,332,380
16	Derivado de quercetina	30,56	266,350

5.1.2 *P. granatum*

O *screening* por HPLC-PAD do **EB EtOH 70%** e das frações **AcOEt**, ***n*-BuOH** e **H₂O**, resultante da percolação das cascas do fruto de *P. granatum*, revelou também 16 compostos (**Tabela 3**), por meio da combinação da interpretação do tempo de retenção e dos espectros na região do UV para os picos obtidos através do detector de fotodiodos (PAD), realizando varredura na faixa espectral de 200 a 600 nm.

Tabela 3. Compostos identificados a partir das cascas dos frutos de *P. granatum* por HPLC-PAD. A sigla n.i. representa compostos não identificados.

Picos	Possível Composto	Tempo De Retenção (Min)	λ máx
1	Punicalina	3,28	254,380
2	n.i.	7,17	266,380
3	Derivado de elagitanino	9,26	260,380
4	n.i.	11,35	254,380
5	Derivado de elagitanino	12,00	260,380
6	Ác. Vanoleico dilactona	12,36	254,374
7	n.i.	14,17	260,374
8	n.i.	14,33	260,374
9	n.i.	15,53	278
10	Derivado de ácido gálico	17,39	272
11	n.i.	18,03	266
12	Derivado de ácido elágico	22,29	254,362
13	Derivado de ácido elágico	24,59	254,362
14	Derivado de ácido elágico	25,64	254,362
15	Derivado de ácido elágico	26,65	254,362
16	Derivado de ácido elágico	28,88	254,368

5.2 Viabilidade *in vitro* dos FGH frente às diferentes concentrações dos extratos brutos e das frações das plantas, *E. giganteum* ou *P. granatum*, após diferentes períodos

5.2.1 *E. giganteum* (EB EtOH 70%)

Em todos os períodos avaliados, o contato com o **EB EtOH 70%** de *E. giganteum* resultou em uma variação do percentual de viabilidade dos FGH concentração-dependente. Nas concentrações de 0.23, 0.47, 0.94 e 1.88 mg, a média de viabilidade foi mantida entre 70 a 100%, mesmo após 60 h de contato. Entretanto, o contato *in vitro* com as maiores concentrações, ou seja, 3.75, 7.5, 15 e

30 mg, afetou mais ainda a viabilidade celular, resultando em uma redução de 30 a 70%. Isto demonstra o potencial citotóxico desta planta nessas concentrações (**Gráfico 1**). Esses resultados foram observados a partir de 12 h e mantiveram-se ao longo dos períodos, exceto para a concentração 3.75, a qual em contato com as células resultou em uma média aproximada de 70% de viabilidade no período de 60 h.

Gráfico 1. Percentual de viabilidade *in vitro* de FGH, na presença das diferentes concentrações (0.23, 0.47, 0.94, 1.88, 3.75, 7.5, 15 e 30 mg/mL) do EB EtOH 70% de *E. giganteum*, nos períodos de 12, 24, 36 e 60 h. Os percentuais foram obtidos em comparação àqueles referentes ao controle (Meio). Concentrações que resultaram em viabilidade celular menor que 70% (percentual demarcado por linha vermelha) foram consideradas citotóxicas, segundo padrão internacional ISO nº 10993-5. Dados representativos de três experimentos independentes, obtidos por meio do ensaio LIVE/DEAD.

Considerando as diferenças estatisticamente significativas, após 12 h, as concentrações de **EB EtOH 70%** de *E. giganteum* que variavam de 3.75 a 30 resultaram em menores percentuais de viabilidade de FGH, comparando com as concentrações mais baixas (0.23, 0.47, 0.94 e 1.88 mg) e com o Controle (**Figura 5** e **Tabela 4**). No período de 24 h, as medianas dos percentuais de viabilidade,

obtidos após contato celular com o **EB EtOH 70%** de *E. giganteum* nas concentrações de 0.47, 0.94 e 1.88 mg, foram maiores que aqueles referentes às concentrações de 7.5 e 15 mg. De forma semelhante, as medianas dos percentuais de viabilidade, obtidos após contato celular com este extrato nas concentrações de 0.47 e 1.88 mg, foram maiores que aqueles referentes às concentrações de 30 mg. Comparando-se com o Controle, FGH em contato com este extrato nas concentrações de 7.5, 15 e 30 mg demonstraram menor viabilidade.

Após 36 e 60 h, observou-se novamente que, na presença do **EB EtOH 70%** de *E. giganteum*, nas suas concentrações mais altas, ou seja a partir de 3.75 mg, os FGH demonstraram redução significativa da viabilidade em relação ao Controle correspondente.

Figura 5. Comparação dos percentuais (médias ou medianas) de viabilidade dos FGH, após contato com as diferentes concentrações de EB EtOH 70% do *E. giganteum*, ou com o meio de cultura (Controle - C, considerado 100% de viabilidade), em cada um dos períodos avaliados. Dados representativos de três experimentos independentes, obtidos por meio do ensaio LIVE/DEAD. Símbolos diferentes (*, # e &) representam diferenças estatísticas significativas entre si ($p < 0.05$). A letra a representa $p < 0.05$ em relação ao Controle.

Tabela 4. Valores percentuais da média e mediana, resultado mínimo, máximo e desvio padrão (D.P.) do teste de viabilidade, obtidos a partir do contato dos FGH com as diferentes concentrações (0.23, 0.47, 0.94, 1.88, 3.75, 7.5, 15 e 30 mg/mL) do **EB EtOH 70%** de *E. giganteum*, nos períodos de 12, 24, 36 e 60 h.

	Concentrações (mg/mL)							
	0.23	0.47	0.94	1.88	3.75	7.5	15	30
12h								
Mediana	95	103	98	86	48	44	47	55
Média	95.56	103	95.11	87.78	51.56	43.11	51	48.67
Mín.	83	94	78	57	36	32	37	31
Máx.	106	110	106	113	73	59	73	65
D.P.	9.03	5.61	9.12	17.31	16.5	9.43	12.97	12.19
24h								
Mediana	87	93	79	97	52	50	46	50
Média	82.11	97.33	88.89	98.33	58.33	48.89	49.33	40.86
Mín.	36	76	71	73	43	41	39	12
Máx.	117	113	116	124	93	57	64	67
D.P.	26.65	14.72	16.62	16.81	16.21	5.33	8.57	25.57
36h								
Mediana	87	96	87	79	41	30	39	13
Média	85.33	94	82.89	74.78	41.44	29.11	36.11	27.78
Mín.	50	76	43	45	32	13	13	4
Máx.	117	118	100	114	48	36	54	55
D.P.	18.09	14.09	17.37	24.27	5.12	6.52	15.77	23.71
60h								
Mediana	91	91	90	97	75	33	29	19
Média	91.22	92.78	92.56	94.44	73.78	43.38	41	36
Mín.	79	74	83	75	33	29	19	7
Máx.	111	109	111	109	97	69	53	66
D.P.	9.32	11.99	9.02	11.73	22.93	15.68	10.55	30.41

Em concordância com os resultados quantitativos, as menores concentrações do **EB EtOH 70%** de *E. giganteum* (0.23, 0.47, 0.94 e 1.88 mg) resultaram em maior densidade celular. As células apresentaram aspecto fusiforme

e alongado, semelhantes às células mantidas no meio de cultura (Meio). Diferentemente, uma diminuição aparente da densidade celular e alteração da morfologia celular foram observadas gradualmente a partir do contato com 3.75 mg/mL deste extrato. Nesse caso, as células apresentaram formato arredondado, diferindo da normalidade morfológica dos FGH (**Figuras 6, 7, 8 e 9**).

Figura 6. Aspectos morfológicos dos FGH após 12 h em contato com as diferentes concentrações (0.23, 0.47, 0.94, 1.88, 3.75, 7.5, 15 ou 30 mg/mL) do EB EtOH 70% de *E. giganteum*. Como controles, FGH foram mantidos apenas em meio de cultura (Meio) ou expostos ao Metanol para indução da morte das células. Microscopia invertida de fluorescência; tamanho final 100 x.

Figura 7. Aspectos morfológicos dos FGH após 24 h em contato com as diferentes concentrações (0.23, 0.47, 0.94, 1.88, 3.75, 7.5, 15 ou 30 mg/mL) do EB EtOH 70% de *E. giganteum*. Como controles, FGH foram mantidos apenas em meio de cultura (Meio) ou expostos ao Metanol para indução da morte das células. Microscopia invertida de fluorescência; tamanho final 100 x.

Figura 8. Aspectos morfológicos dos FGH após 36 h em contato com as diferentes concentrações (0.23, 0.47, 0.94, 1.88, 3.75, 7.5, 15 ou 30 mg/mL) do EB EtOH 70% de *E. giganteum*. Como controles, FGH foram mantidos apenas em meio de cultura (Meio) ou expostos ao Metanol para indução da morte das células. Microscopia invertida de fluorescência; tamanho final 100 x.

Figura 9. Aspectos morfológicos dos FGH após 60 h em contato com as diferentes concentrações (0.23, 0.47, 0.94, 1.88, 3.75, 7.5, 15 ou 30 mg/mL) do EB EtOH 70% de *E. giganteum*. Como controles, FGH foram mantidos apenas em meio de cultura (Meio) ou expostos ao Metanol para indução da morte das células. Microscopia invertida de fluorescência; tamanho final 100 x.

5.2.2 *E. giganteum* (CH₂Cl₂)

Avaliando o contato dos FGH com a fração CH₂Cl₂ de *E. giganteum*, notou-se uma média de viabilidade superior a 70% em todos os períodos, somente na concentração de 0.23 mg. Com o aumento da concentração, as médias de viabilidade dos FGH reduziram progressivamente. As concentrações de 0.47, 0.94, 1.88, 3.75 e 7.5 mg resultaram em respostas celulares similares ao longo dos períodos, com redução de viabilidade em 24 e 60 h. Entretanto, as maiores concentrações, 15 e 30 mg, reduziram mais a viabilidade de FGH, a qual não alcançou uma média de 40%, em nenhum dos períodos (**Gráfico 2**).

Gráfico 2. Percentuais de viabilidade *in vitro* de FGH, na presença das diferentes concentrações 0.23, 0.47, 0.94, 1.88, 3.75, 7.5, 15 e 30 mg/mL da fração CH₂Cl₂ de *E. giganteum*, nos períodos de 12, 24, 36 e 60 h. Os percentuais foram obtidos em comparação àqueles referentes ao controle (Meio). Concentrações que resultaram em viabilidade celular menor que 70% (percentual demarcado por linha vermelha) foram consideradas citotóxicas, segundo padrão internacional ISO nº 10993-5. Dados representativos de três experimentos independentes, obtidos pelo kit comercial LIVE/DEAD® (Viability/Cytotoxicity Kit, L-3224).

As menores concentrações da fração CH_2Cl_2 de *E. giganteum* não afetaram a viabilidade dos FGH, principalmente nos períodos iniciais. No período de 12 h, baixa viabilidade celular foi observada após contato com a fração CH_2Cl_2 de *E. giganteum*, nas concentrações de 15 e 30 mg, com diferenças estatisticamente significantes em relação ao Controle. Com 24 e 36 h, as concentrações 7.5, 15 e 30 mg resultaram em menor viabilidade em comparação ao Controle. Após 60 h, os valores (medianas) de viabilidade de FGH, mantidos apenas em meio de cultura (Controle), apresentaram-se diferentes em comparação àqueles relacionados às concentrações de 3.75, 7.5, 15 e 30 mg (Figura 10 e Tabela 5).

Figura 10. Comparação dos percentuais (médias ou medianas) de viabilidade dos FGH, após contato com as diferentes concentrações de CH_2Cl_2 do *E. giganteum*, ou com o meio de cultura (Controle - C, considerado 100% de viabilidade), em cada um dos períodos avaliados. Dados representativos de três experimentos independentes, obtidos por meio do ensaio LIVE/DEAD. Símbolos diferentes (*, # e &) representam diferenças estatísticas significativas entre si ($p < 0.05$). A letra a representa $p < 0.05$ em relação ao Controle.

Tabela 5. Valores percentuais da média e mediana, resultado mínimo, máximo e desvio padrão (D.P.) do teste de viabilidade, obtidos a partir do contato dos FGH com as diferentes concentrações (0.23, 0.47, 0.94, 1.88, 3.75, 7.5, 15 e 30 mg/mL) da fração CH_2Cl_2 de *E. giganteum*, nos períodos de 12, 24, 36 e 60 h.

	Concentrações (mg/mL)							
	0.23	0.47	0.94	1.88	3.75	7.5	15	30
12h								
Mediana	79	90	63.5	65	84	81	33	15
Média	87.44	82.67	65.88	69.33	83	67.89	35.11	16.67
Mín.	55	41	23	29	53	27	21	10
Máx.	129	117	127	108	110	96	53	29
D.P.	29.36	29.07	41.96	34.29	20.09	25.68	10.68	6.79
24h								
Mediana	80	62.50	51	51.50	49	27.50	30	26.5
Média	89.86	65	53.50	56.38	52.25	40.38	33.88	24.63
Mín.	75	49	36	27	29	21	13	12
Máx.	123	88	68	91	80	72	56	36
D.P.	18.98	12.09	11.30	23.88	19.93	22.04	16.64	8.52
36h								
Mediana	79	92	91	88	91	76	30	24
Média	89.67	93.11	87.67	84.67	88.33	71.22	36.56	22.67
Mín.	52	74	73	54	48	38	18	18
Máx.	135	111	109	105	120	95	65	27
D.P.	27.10	13.20	12.44	18.32	22.04	17.73	16.90	3.43
60h								
Mediana	85.50	78	62.50	54	40.50	31.50	16	10
Média	87.38	76.88	60.75	52	43.75	37	20.50	11.22
Mín.	82	46	41	30	31	13	8	8
Máx.	99	99	73	70	74	70	43	16
D.P.	5.73	16.46	10.17	17.64	13.88	18.53	12.62	2.91

As Figuras 11, 12, 13 e 14 demonstram os aspectos morfológicos dos FGH em contato com as diferentes concentrações da fração CH_2Cl_2 de *E. giganteum*. Analisando os quatro períodos e as oito concentrações testadas, notamos que também ocorreu uma diminuição na densidade celular de maneira concentração-dependente, com alteração morfológica dos FGH frente as maiores concentrações. Tais alterações celulares incluem redução de tamanho, perda do formato fusiforme com aquisição de uma forma arredondada. Frente a maior concentração (30 mg) somente células com essa morfologia foram observadas.

Figura 11. Aspectos morfológicos dos FGH após 12 h em contato com as diferentes concentrações (0.23, 0.47, 0.94, 1.88, 3.75, 7.5, 15 ou 30 mg/mL) de CH_2Cl_2 de *E. giganteum*. Como controles, FGH foram mantidos apenas em meio de cultura (Meio) ou expostos ao Metanol para indução da morte das células. Microscopia invertida de fluorescência; tamanho final 100 x.

Figura 12. Aspectos morfológicos dos FGH após 24 h em contato com as diferentes concentrações (0.23, 0.47, 0.94, 1.88, 3.75, 7.5, 15 ou 30 mg/mL) de CH_2Cl_2 de *E. giganteum*. Como controles, FGH foram mantidos apenas em meio de cultura (Meio) ou expostos ao Metanol para indução da morte das células. Microscopia invertida de fluorescência; tamanho final 100 x.

Figura 13. Aspectos morfológicos dos FGH após 36 h em contato com as diferentes concentrações (0.23, 0.47, 0.94, 1.88, 3.75, 7.5, 15 ou 30 mg/mL) de CH_2Cl_2 de *E. giganteum*. Como controles, FGH foram mantidos apenas em meio de cultura (Meio) ou expostos ao Metanol para indução da morte das células. Microscopia invertida de fluorescência; tamanho final 100 x.

Figura 14. Aspectos morfológicos dos FGH após 60 h em contato com as diferentes concentrações (0.23, 0.47, 0.94, 1.88, 3.75, 7.5, 15 ou 30 mg/mL) de CH_2Cl_2 de *E. giganteum*. Como controles, FGH foram mantidos apenas em meio de cultura (Meio) ou expostos ao Metanol para indução da morte das células. Microscopia invertida de fluorescência; tamanho final 100 x.

5.2.3. *P. granatum* (EB EtOH 70%)

Houve a sobrevivência de mais de 70% dos FGH após contato *in vitro* com o **EB EtOH70%** de *P. granatum*, nas suas menores concentrações, ou seja 0.23, 0.47, 0.93, 1.88 e 3.75, exceto após 60 h, frente a concentração de 3.75 mg/mL. Como observado para *E. giganteum*, na presença do extrato bruto de *P. granatum* nas suas maiores concentrações, ou seja 7.5, 15 e 30 mg, a viabilidade dos fibroblastos foi prejudicada, demonstrando uma queda diretamente proporcional ao aumento da concentração (**Gráfico 3**).

Gráfico 3. Percentuais de viabilidade *in vitro* de FGH, na presença das diferentes concentrações 0.23, 0.47, 0.94, 1.88, 3.75, 7.5, 15 e 30 mg/mL do EB EtOH 70% de *P. granatum* nos períodos de 12, 24, 36 e 60 h. Os percentuais foram obtidos em comparação àqueles referentes ao controle (Meio). Concentrações que resultaram em viabilidade celular menor que 70% (percentual demarcado por linha vermelha) foram consideradas citotóxicas, segundo padrão internacional ISO nº 10993-5. Dados representativos de três experimentos independentes, obtidos pelo kit comercial LIVE/DEAD® (Viability/Cytotoxicity Kit, L-3224).

Nos períodos de 12 e 24 h, sob as concentrações de 0.23 a 1.88 mg, a viabilidade celular foi mantida em relação àquela observada entre as células mantidas no meio de cultura adequado (Controle). Por outro lado, sob as concentrações de 15 e 30 mg, houve redução da viabilidade celular em comparação às concentrações menores. Após 36 e 60 h, as maiores concentrações deste extrato continuaram a resultar em prejuízo da viabilidade dos FGH, com valores que diferiram daqueles relacionados ao Controle correspondente (**Figura 15 e Tabela 6**).

Figura 15. Comparação dos percentuais (médias ou medianas) de viabilidade dos FGH, após contato com as diferentes concentrações do EB EtOH 70% CH₂Cl₂ de *P. granatum*, ou com o meio de cultura (Controle - C, considerado 100% de viabilidade), em cada um dos períodos avaliados. Dados representativos de três experimentos independentes, obtidos por meio do ensaio LIVE/DEAD. Símbolos diferentes (*, # e &) representam diferenças estatísticas significativas entre si (p<0.05). A letra a representa p<0.05 em relação ao Controle.

Tabela 6. Valores percentuais da média e mediana, resultado mínimo, máximo e desvio padrão (D.P.) do teste de viabilidade, obtidos a partir do contato dos FGH com as diferentes concentrações (0.23, 0.47, 0.94, 1.88, 3.75, 7.5, 15 e 30 mg/mL) do **EB EtOH 70%** de *P. granatum*, nos períodos de 12, 24, 36 e 60 h.

	Concentrações (mg/mL)							
	0.23	0.47	0.94	1.88	3.75	7.5	15	30
12h								
Mediana	112	115	113	107	80	70.50	28	22
Média	111.9	113.4	111.3	106.7	85.56	73	29.63	21.44
Mín.	101	94	98	81	71	61	14	19
Máx.	121	130	125	129	111	87	46	26
D.P.	8.05	10.36	8.99	15.11	13.96	9.19	12.66	2.13
24h								
Mediana	112	110	92	96	79	53	24	17
Média	115	110.6	95.78	92.44	76.33	44.89	22.22	22.33
Mín.	103	96	70	79	54	24	11	14
Máx.	129	121	120	104	93	66	34	39
D.P.	9.17	7.97	14.32	8.14	10.61	17.44	8.59	9.99
36h								
Mediana	95	88	91	96	83	80	28	13
Média	92.22	89.22	90.22	100.9	72.89	61.89	29.67	20.33
Mín.	69	79	77	80	45	9	21	10
Máx.	111	102	120	128	97	100	47	39
D.P.	12.7	8.04	13.52	19.87	19.81	39.67	9.09	13.1
60h								
Mediana	101.5	89	89	76	61	32	12	12
Média	100.6	90.13	87.38	75.13	59.78	37.50	13.22	11.67
Mín.	78	74	51	50	42	15	10	9
Máx.	119	104	112	98	78	65	28	13
D.P.	12.21	9.98	18.48	16.32	11.33	19.89	5.60	1.41

A análise morfológica dos FGH, em contato com o **EB EtOH 70%** de *P. granatum*, foi concordante com os resultados quantitativos de viabilidade. Assim, células em contato com este extrato nas suas menores concentrações, (0.23, 0.47,

0.94 e 1.88 e 3.75 mg) apresentaram uma densidade celular similar e morfologia comparável ao Controle, ao longo de todos os períodos. Poucas células mostraram-se com diminuição de tamanho ou morfologia arredondada. A densidade dos FGH, em contato com este extrato a 7.5 mg, estava reduzida após 24 e 60 h, e células com morfologia fusiforme e alongada somente eram observadas no período de 36 h. Por fim, na presença do extrato nas suas maiores concentrações, 15 e 30 mg, os fibroblastos apresentaram-se menores e arredondados, embora com manutenção da densidade em relação ao Controle (**Figuras 16, 17, 18 e 19**).

Figura 16. Aspectos morfológicos dos FGH após 12 h em contato com as diferentes concentrações (0.23, 0.47, 0.94, 1.88, 3.75, 7.5, 15 ou 30 mg/mL) do EB EtOH 70% de *P. granatum*. Como controles, FGH foram mantidos apenas em meio de cultura (Meio) ou expostos ao Metanol para indução da morte das células. Microscopia invertida de fluorescência; tamanho final 100 x.

Figura 17. Aspectos morfológicos dos FGH após 24 h em contato com as diferentes concentrações (0.23, 0.47, 0.94, 1.88, 3.75, 7.5, 15 ou 30 mg/mL) do EB EtOH 70% de *P. granatum*. Como controles, FGH foram mantidos apenas em meio de cultura (Meio) ou expostos ao Metanol para indução da morte das células. Microscopia invertida de fluorescência; tamanho final 100 x.

Figura 18. Aspectos morfológicos dos FGH após 36 h em contato com as diferentes concentrações (0.23, 0.47, 0.94, 1.88, 3.75, 7.5, 15 ou 30 mg/mL) do EB EtOH 70% de *P. granatum*. Como controles, FGH foram mantidos apenas em meio de cultura (Meio) ou expostos ao Metanol para indução da morte das células. Microscopia invertida de fluorescência; tamanho final 100 x.

Figura 19. Aspectos morfológicos dos FGH após 60 h em contato com as diferentes concentrações (0.23, 0.47, 0.94, 1.88, 3.75, 7.5, 15 ou 30 mg/mL) do EB EtOH 70% de *P. granatum*. Como controles, FGH foram mantidos apenas em meio de cultura (Meio) ou expostos ao Metanol para indução da morte das células. Microscopia invertida de fluorescência; tamanho final 100 x.

5.2.4 *P. granatum* (AcOEt)

A fração **AcOEt** de *P. granatum*, nas concentrações de 0.23 e 0.47 mg, resultou em uma sobrevivência de FGH acima de 70%, em todos os períodos avaliados. Células em contato com esta fração a 0.23 mg apresentaram viabilidade similar ao Controle, ou seja 100% de sobrevivência em todos os períodos, demonstrando uma

média de 114% em 60 h. Sob as demais concentrações, as médias dos percentuais de viabilidade celular variaram de 14 a 68%, exceto no período de 12h, à concentração de 3.75 mg (média de 77%). A citotoxicidade tornou-se aparente com o aumento das concentrações da fração **AcOEt** de *P. granatum*, não apresentando modificações significativas com o passar do tempo (**Gráfico 4**).

Gráfico 4. Percentuais de viabilidade *in vitro* de FGH, na presença das diferentes concentrações 0.23, 0.47, 0.94, 1.88, 3.75, 7.5, 15 e 30 mg/mL de AcOEt de *P. granatum* nos períodos de 12, 24, 36 e 60 h. Os percentuais foram obtidos em comparação àqueles referentes ao controle (Meio). Concentrações que resultaram em viabilidade celular menor que 70% (percentual demarcado por linha vermelha) foram consideradas citotóxicas, segundo padrão internacional ISO nº 10993-5. Dados representativos de três experimentos independentes, obtidos pelo kit comercial LIVE/DEAD® (Viability/Cytotoxicity Kit, L-3224).

Após 12 h, as concentrações de 0.23, 0.47 e 3.75 da fração **AcOEt** de *P. granatum* não levaram à alteração da viabilidade de FGH *in vitro* em relação ao Controle. Diferentemente do extrato, a fração de *P. granatum* foi citotóxica quando na concentração de 0.94. Após 24 h, as concentrações mais tóxicas aos fibroblastos foram 3.75, 7.5, 15 e 30 mg, cujas medianas de viabilidade diferiram

significativamente daquela referente ao Controle correspondente. Nos períodos de 36 e 60 h, as células demonstraram importante prejuízo da sua viabilidade quando em contato com a maioria das concentrações testadas, ou seja a partir de 0.94, cujas médias dos percentuais foram inferiores àsquelas observadas nos Controles correspondentes (**Figura 20 e Tabela 7**).

Figura 20. Comparação dos percentuais (médias ou medianas) de viabilidade dos FGH, após contato com as diferentes concentrações de AcOEt de *P. granatum*, ou com o meio de cultura (Controle - C, considerado 100% de viabilidade), em cada um dos períodos avaliados. Dados representativos de três experimentos independentes, obtidos por meio do ensaio LIVE/DEAD. Símbolos diferentes (*, # e &) representam diferenças estatísticas significativas entre si ($p < 0.05$). A letra a representa $p < 0.05$ em relação ao Controle.

Tabela 7. Valores percentuais da média e mediana, resultado mínimo, máximo e desvio padrão (D.P.) do teste de viabilidade, obtidos a partir do contato dos FGH com as diferentes concentrações (0.23, 0.47, 0.94, 1.88, 3.75, 7.5, 15 e 30 mg/mL) da fração **AcOEt** de *P. granatum*, nos períodos de 12, 24, 36 e 60 h.

	Concentrações (mg/mL)							
	0.23	0.47	0.94	1.88	3.75	7.5	15	30
12h								
Mediana	108	105.5	34.5	76	80	53	23	28
Média	102.3	109.8	34.13	68.33	77.33	53.78	23.22	28
Mín.	68	95	23	29	48	35	20	20
Máx.	120	143	54	98	97	66	26	36
D.P.	16.92	16.79	9.86	26.32	15.67	9.28	1.99	4.87
24h								
Mediana	101.5	83	61	42.5	31	28.5	32	26
Média	101	77.50	60.13	55.25	35.63	31.25	31.38	26.38
Mín.	82	55	26	36	22	12	15	21
Máx.	138	95	86	85	52	55	49	34
D.P.	18.71	14.71	19.53	22.37	12.15	16.32	12.91	4.17
36h								
Mediana	101	72	54	64	31	28	23	20
Média	104.2	88.11	55.63	57.78	38	37.11	22.22	18.67
Mín.	83	51	31	24	15	19	15	14
Máx.	133	133	86	100	70	68	29	23
D.P.	17.87	29.90	17.85	24.74	18.66	19.17	3.96	3.08
60h								
Mediana	113	106	58	48	28	23	15	16.5
Média	114.2	100	46.71	45.57	34.86	24.43	14.75	16.63
Mín.	87	64	19	37	21	14	9	14
Máx.	140	128	64	55	51	41	19	19
D.P.	21.83	26.73	19.47	6.27	11.89	8.52	3.69	1.92

A densidade dos fibroblastos em contato com a fração de *P. granatum* apresentou-se semelhante ao Controle ao longo dos períodos, somente nas concentrações de 0.23 e 0.47 mg. Ainda, as células, nestas condições,

demonstraram morfologia alongada e fusiforme, em todos os períodos. De acordo com o esperado para um perfil de citotoxicidade concentração-dependente, a densidade celular diminuiu, a morfologia celular alterou-se para um aspecto arredondado e as células tornaram-se menores em tamanho, proporcionalmente ao aumento das concentrações. Sob contato com esta fração nas concentrações de 15 e 30 mg, somente células arredondadas e menores eram presentes (**Figuras 21, 22, 23 e 24**).

Figura 21. Aspectos morfológicos dos FGH após 12 h em contato com as diferentes concentrações (0.23, 0.47, 0.94, 1.88, 3.75, 7.5, 15 ou 30 mg/mL) de AcOEt de *P. granatum*. Como controles, FGH foram mantidos apenas em meio de cultura (Meio) ou expostos ao Metanol para indução da morte das células. Microscopia invertida de fluorescência; tamanho final 100 x.

Figura 22. Aspectos morfológicos dos FGH após 24 h em contato com as diferentes concentrações (0.23, 0.47, 0.94, 1.88, 3.75, 7.5, 15 ou 30 mg/mL) de AcOEt de *P. granatum*. Como controles, FGH foram mantidos apenas em meio de cultura (Meio) ou expostos ao Metanol para indução da morte das células. Microscopia invertida de fluorescência; tamanho final 100 x.

Figura 23. Aspectos morfológicos dos FGH após 36 h em contato com as diferentes concentrações (0.23, 0.47, 0.94, 1.88, 3.75, 7.5, 15 ou 30 mg/mL) de AcOEt de *P. granatum*. Como controles, FGH foram mantidos apenas em meio de cultura (Meio) ou expostos ao Metanol para indução da morte das células. Microscopia invertida de fluorescência; tamanho final 100 x.

Figura 24. Aspectos morfológicos dos FGH após 60 h em contato com as diferentes concentrações (0.23, 0.47, 0.94, 1.88, 3.75, 7.5, 15 ou 30 mg/mL) de AcOEt de *P. granatum*. Como controles, FGH foram mantidos apenas em meio de cultura (Meio) ou expostos ao Metanol para indução da morte das células. Microscopia invertida de fluorescência; tamanho final 100 x.

6 DISCUSSÃO

6 DISCUSSÃO

O interesse na investigação do potencial terapêutico e na validação científica de plantas medicinais tem aumentado consideravelmente na atualidade, já que estas plantas têm sido consideradas fontes eminentes de novos agentes terapêuticos (BIN- HAFEEZ et al., 2003). Como há muito tempo as plantas têm sido utilizadas pela humanidade para cura de muitos males, a grande maioria da população acredita que essas plantas já foram testadas e homologadas, pelo uso prolongado na espécie humana, e que tais vegetais são medicamentos seguros e eficazes, isentos de efeitos colaterais, não necessitando de avaliações de segurança. Porém, essas plantas podem apresentar substâncias consideradas xenobióticas, ou seja, compostos químicos estranhos ao organismo, os quais podem ser potencialmente tóxicos (LAPA et al., 2007).

Estudos com cultura de células são os primeiros testes que devem ser realizados sobre a toxicidade de um material com potencial terapêutico, e ajudam a estimar níveis mais seguros para pesquisas sobre toxicidade em modelos experimentais utilizando animais, considerando os aspectos éticos e legais (FIDALGO et al., 2009).

Os fibroblastos têm sido preferencialmente utilizados para estes ensaios *in vitro*. Essas células têm papel principal na regeneração de tecidos, chegam ao local da lesão em uma fase muito precoce e se proliferam rapidamente, levando a cicatrização. Além disso, são capazes de sintetizar vários fatores de crescimento e citocinas envolvidos no processo de cicatrização, regulam a deposição da matriz colágena e estimulam a diferenciação das células epiteliais. Sua capacidade de migrar para os tecidos lesionados possibilita que os fibroblastos sejam facilmente mantidos em cultura. Estas características fazem com que os fibroblastos sejam células de escolha para muitos estudos biológicos celulares (ERDAG; SHERIDAN, 2004; ALMQVIST et al., 2009; ALBERTS et al., 2010).

Nos ensaios laboratoriais, os fibroblastos podem ser obtidos comercialmente e estas linhagens celulares são, na sua maioria, adquiridas na ATCC (American Type Culture Collection), um banco privado de recursos biológicos

que viabiliza a aquisição, autenticação, produção e desenvolvimento de microrganismos, linhagens celulares e outros materiais utilizados em pesquisas (BERNS; BOND; MANNING, 1996). Entretanto, estas linhagens requerem processos de importação, com aumento do custo e demandas burocráticas, que podem dificultar a pesquisa científica.

Outra opção para a obtenção de células, para ensaios laboratoriais, é se estabelecer uma cultura primária, e para isso, suas interações célula-célula devem ser rompidas. Essa desagregação pode ser obtida mecanicamente, a partir da migração das células do fragmento de tecido, ou enzimaticamente, pela ação de alguns agentes como a tripsina e o EDTA. Para o isolamento de outro tipo celular, algumas precauções especiais devem ser tomadas para a remoção dos fibroblastos, por serem, em cultivo, células predominantes, geralmente se dividindo mais rápido do que as outras células (SATO et al., 1994; FRESHNEY, 2000; COURA et al., 2005; LODISH et al., 2014).

No presente trabalho, utilizamos fibroblastos gengivais humanos (FGH), derivados de fragmentos de gengiva de voluntários, pela técnica de explante, que consiste no cultivo de fragmentos de tecidos ou órgãos, e obtidos em meio adequado de crescimento celular. Os fragmentos aderidos à superfície do frasco apropriado liberam espontaneamente as células, de maneira a formar a camada monocelular (cultura primária). São considerados como vantagens da cultura primária, em comparação à obtenção comercial, alguns aspectos, tais como forte expressão de função especializada quando estas células se tornam confluentes e também durante esse período de confluência, aparência morfológica das células similar ao tecido original e, após a terceira passagem, as células adquirem estabilidade, tornam-se resistentes e apresentam rápida proliferação (FRESHNEY, 2000).

Assim, considerando as vantagens das culturas celulares primárias e a necessidade de um maior esclarecimento sobre a toxicidade de plantas medicinais usadas na odontologia, o presente estudo teve como propósito verificar *in vitro* o possível efeito citotóxico das plantas *Equisetum giganteum* e *Punica granatum*, por meio da análise da viabilidade de FGH após o contato direto com seus extratos brutos, bem como com as frações que demonstraram melhor atividade

antimicrobiana contra *C. albicans*.

Nosso interesse científico em avaliar respostas celulares e ações antimicrobianas frente a *C. albicans* justifica-se pelo fato que este microrganismo está fortemente associado com a etiopatogenia e a exacerbação da estomatite protética, uma das lesões mais prevalentes em portadores de próteses totais removíveis, acometendo a mucosa bucal que fica em contato direto com a superfície de resina acrílica termopolimerizável destas próteses, principalmente total superior (BUDTZ-JORGENSEN, 1978; LEMOS; MIRANDA; SOUZA, 2003). Em estudos de nossa equipe, *E. giganteum* e *P. granatum* demonstraram ações benéficas, atuando como microbicidas frente a *C. albicans*, podendo ser uma opção no tratamento tópico da estomatite protética, ao serem aplicados na superfície de próteses removíveis ou ainda incorporados em materiais odontológicos como por exemplo os adesivos protéticos (ALAVARCE et al., 2015, ALMEIDA, 2016).

Para tal, são necessárias investigações de biocompatibilidade, avaliando os possíveis efeitos nocivos que estas plantas medicinais possam causar. Os estudos *in vitro* permitem determinar efeitos citotóxicos de materiais que permanecerão em contato com tecidos humanos e devem ser feitos através de técnicas rápidas, reprodutíveis e com monitoramento dos efeitos ao longo do tempo experimental (SCHMALZ et al., 2002; CAVALCANTI et al., 2006).

Com relação às plantas estudadas neste trabalho, poucos trabalhos foram publicados a respeito das propriedades terapêuticas de *E. giganteum*. ALAVARCE et al, em 2015, observaram que além do efeito microbicida, *E. giganteum* produziu uma resposta anti-inflamatória sobre monócitos humanos, quando ativados por *C. albicans*. A viabilidade de monócitos humanos e de células epiteliais de palato humano não foi comprometida na presença desta planta.

Em contrapartida, *P. granatum* vem sendo amplamente estudada por possuir vários efeitos biológicos, podendo ajudar a prevenir ou tratar vários fatores de risco de doenças, incluindo pressão arterial elevada, colesterol alto, estresse oxidativo, hiperglicemia e processos inflamatórios (ZARFESHANY; ASGARY; JAVANMARD, 2014, PEREIRA; PAULA; VALADARES, 2005, WERKMAN et al., 2008). Esta planta vem sendo também muito investigada em odontologia, visando o

controle de microrganismos presentes no biofilme dentário (ALVES et al., 2009, MOHIRE; YADAV, 2010). Como exemplo, VASCONCELOS et al, em 2006, demonstraram *in vitro* que a incorporação do extrato bruto de *P. granatum* em um gel básico inibiu a adesão, em tubos de hemólise, de diferentes microrganismos encontrados na cavidade oral, como *Streptococos mutans*, *Streptococos sanguis*, *Streptococos mitis* e *C. albicans*.

Nossa equipe de pesquisa, observou que a associação de *E. giganteum* ou *P. granatum* ao adesivo protético COREGA® reduziram significativamente o biofilme de *C. albicans* sobre a superfície de resina acrílica termoplimerizável quando comparado a superfície tratada somente com o adesivo, sem nenhuma associação. Essa idéia parece ser promissora na colaboração para o tratamento e/ou prevenção da estomatite protética em situações de reinfecção por *C. albicans* (ALMEIDA, 2015).

A avaliação de citotoxicidade de uma planta com ações benéficas à saúde humana pode ser feita através de ensaios qualitativos ou quantitativos. Os ensaios qualitativos consistem na avaliação da morfologia através de descrição ou atribuição de escores. Os ensaios quantitativos caracterizam-se pela quantificação do número ou da atividade celular, após a exposição ao agente teste (ISO 10993-5).

Para detecção *in vitro* da citotoxicidade, um teste bastante sensível e muito utilizado é o ensaio colorimétrico com base no sal tetrazolium MTT (brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-yl)-2,5-difeniltetrazólio), o qual mensura a atividade metabólica celular através de enzimas ativas em células viáveis por meio da conversão do MTT, hidrossolúvel e de cor amarelada, em cristais de formazan, insolúveis e de cor azul escura, que são posteriormente solubilizados para se determinar a sua concentração por densidade óptica em espectrofotometria, quantificando portanto as células viáveis (MOSMANN, 1983; HANSEN; NIELSEN; BERG, 1989). Segundo SHOEMAKER et al, 2004, ao se utilizar o ensaio MTT para testar a citotoxicidade de extratos de plantas, os resultados obtidos podem não refletir a verdadeira viabilidade celular, pois os extratos podem ter uma possível reação direta com o MTT, produzindo um resultado falso-positivo. Após incubação de vários extratos de plantas com MTT (na ausência de células), observou-se uma

redução rápida e significativa do MTT. NATARAJAN et al, 2000, relataram que vários antioxidantes diferentes poderiam reduzir MTT na ausência de células.

Sendo assim, em nosso trabalho, foi utilizado o kit comercial LIVE/DEAD® Viability/Cytotoxicity Kit (Invitrogen), compatível apenas para células de mamíferos e capaz de medir a atividade intracelular das esterases (calceína) e a integridade da membrana plasmática (homodímero de etídio). O ensaio LIVE/DEAD® permitiu realizar simultaneamente a avaliação quantitativa da viabilidade dos FGH, através da leitura das URF, bem como a qualitativa, através da observação morfológica e da densidade celular. Assim, foi possível comparar duas formas de avaliação e obter resultados com confiabilidade.

Outros pesquisadores também utilizaram este kit para avaliar citotoxicidade de plantas sobre fibroblastos. Por exemplo, PIAIA, 2014, relatou viabilidade de fibroblastos dermais *in vitro*, após contato com extrato de *Aloe vera*, por meio do ensaio MTS [3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-5-(3-carboximetoxifenil)-2-(4-sulfafenil)-2H-tetrazólio] e do kit LIVE/DEAD® Viability/Cytotoxicity (Invitrogen).

Neste presente trabalho, realizamos pela primeira vez testes de citotoxicidade *in vitro*, por meio da avaliação da viabilidade dos FGH frente a diferentes concentrações de *E. giganteum* e de *P. granatum* após 12, 24, 36 e 60 h. Quanto aos nossos resultados, a partir da metodologia selecionada, observou-se que tanto *E. giganteum* quanto *P. granatum* apresentaram uma toxicidade concentração-dependente frente aos FGH. Segundo o padrão internacional da ISO nº 10993-5, para testes quantitativos *in vitro*, redução na viabilidade celular maior que 30% é indicativo de citotoxicidade. Em contato direto com os extratos brutos e com as frações estabelecidas das duas plantas, a redução da viabilidade dos FGH, nas menores concentrações testadas, não ultrapassou 25% (média), sendo que em alguns casos os valores de viabilidade celular foram acima de 100%. A viabilidade dos FGH, frente as duas plantas, apresentou redução progressivamente ao aumento das concentrações, tanto para os extratos quanto para as frações.

Quando consideramos os períodos avaliados, acreditamos que não foram evidenciadas diferenças importantes em nenhuma das duas plantas testadas. Com o decorrer do tempo, as alterações na viabilidade parecem estar mais fortemente

relacionadas com a concentração dos extratos. Contudo, diante dos parâmetros de citotoxicidade avaliados em nosso estudo, as duas plantas parecem demonstrar uma citotoxicidade semelhante, já que nas menores concentrações, independente do tempo a viabilidade e a morfologia dos FGH não foram comprometidas.

Possivelmente, a toxicidade do *E. giganteum* ocorre pela presença dos flavonoides, que podem não só afetar as membranas microbianas, mas também as das células de mamíferos. De fato, foi demonstrado que flavonoides têm a capacidade de inibir a proliferação de células de mamíferos *in vitro*, principalmente células tumorais (GUZMÁN et al., 2009; TAMAKI et al., 2011).

Em nosso estudo, *E. giganteum*, tanto como extrato bruto, quanto na forma fracionada, apresentou em sua constituição flavonoides, como observado após análise fitoquímica por HPLC-PAD. Em resumo, o extrato bruto de *E. giganteum* revelou a presença de compostos fenólicos derivados do ácido cafeico e ácido ferúlico, e de heterosídeos de flavonoides derivados de quercetina do kaempferol, além de estilpironas. Estes resultados corroboram aqueles obtidos previamente por ALAVARCE et al, (2015). A complexidade evidenciada na fração diclorometânica (CH₂Cl₂), por meio do HPLC-PAD, tornou difícil a detecção precisa dos seus compostos, demonstrando que a maioria dos compostos presentes seriam menos polares, ou com média polaridade. Métodos de detecção de compostos mais apolares são necessários para uma análise mais precisa de sua composição.

Por outro lado, em nosso estudo, a composição de *P. granatum* revelou heterosídeos de ácido elágico e elatanginos, como a punicalina, após análise por HPLC-PAD. Esses achados fitoquímicos são parcialmente concordantes com outros trabalhos, que relatam altos níveis de diversos fitoquímicos, como polifenóis, incluindo taninos hidrolisáveis (elagitaninos e galotaninos), taninos condensáveis, antocianinas e flavonoides (SEERAM et al., 2005; ENDO et al., 2010; ANIBAL et al., 2013; VILLALBA et al., 2015).

Não encontramos relação dos taninos com toxicidade sobre tecidos humanos. Possivelmente, os flavonoides, citados frequentemente na literatura como presentes na casca de *P. granatum*, sejam também os responsáveis pela sua citotoxicidade, embora não tenhamos detectado a presença desses compostos na

composição da *P. granatum*, a partir da metodologia utilizada por nós. Isso nos leva a acreditar que, como comprovado por PRASHANTH et al, em 2001, além de concentrações diferentes, diferentes componentes ativos podem ser retirados das plantas por diferentes processos de extração.

Vale ressaltar que os flavonoides, embora com potencial tóxico, apresentam muitas atividades biológicas benéficas, como a ação antioxidante e antimicrobiana (EINBOND et al., 2004; BANERJEE; DASGUPTA; DE, 2005; CHOI et al., 2006). O crescente interesse pelos antioxidantes naturais, dos extratos de plantas, é devido à sua baixa toxicidade em comparação aos antioxidantes sintéticos (WOLFE; WU; LIU, 2003).

Considerando que as diferentes substâncias encontradas nas plantas possam atuar sinérgica ou antagonicamente na indução da citotoxicidade (CHUNG et al., 2004; SERAFIN et al., 2007; HUANG et al., 2008; KWAK et al., 2009), podemos sugerir a utilização de duas ou mais plantas associadas, resultando em efeitos sinérgicos, com o objetivo de aumentar a potencialidade terapêutica com diminuição das concentrações efetivas, o que teoricamente pode diminuir seus efeitos tóxicos. MALVEZZI, em 2010, associou extratos das espécies *Eugenia uniflora* e *P. granatum*, e constatou uma maior inibição do crescimento de *Staphylococcus aureus*, quando se comparou com os extratos isolados, indicando um efeito antimicrobiano sinérgico entre estes extratos. Considerando também a opção de combinações de plantas, CRESCENTI et al, em 2015, determinaram o efeito de uma formulação botânica de *Herniaria glabra*, *Agropyron repens*, *Equisetum arvense* e *Sambucus nigra* como agente preventivo, em um modelo de nefrolitíase experimentalmente induzida em ratos.

Baseado nos estudos realizados pela nossa equipe e relatos convergentes encontrados na literatura, *E. granatum* e *P. granatum* podem estabelecer atividades antimicrobianas, podendo ser aplicadas em várias áreas de saúde, incluído a Odontologia. Acreditamos que as duas plantas possam ser utilizadas como terapia em diversas patologias, desde que em concentrações biocompatíveis.

7 CONCLUSÕES

7 CONCLUSÕES

Levando em consideração as metodologias, resultados e considerando o modelo experimental *in vitro*, conclui-se que:

- 7.1 A análise fitoquímica dos extratos e das frações demonstrou a presença de flavonoides e taninos em *Equisetum giganteum* e *Punica granatum*, respectivamente.
- 7.2 *E. giganteum* e *P. granatum* apresentaram uma toxicidade às células testadas a medida que as concentrações eram aumentadas, independente do decorrer do tempo.

Sendo assim, *E. giganteum* e *P. granatum* demonstraram ter uma citotoxicidade concentração dependente sobre fibroblastos gengivais humanos. A proposta da utilização dessas plantas como terapia contra microrganismos, parece ser promissora, porém se torna necessário se estabelecer uma dose terapêutica adequada e não tóxica. Podemos sugerir uma associação dessas plantas com outras plantas que tiveram sua ação microbiciada comprovada, aumentando as suas potencialidades de ação.

REFERÊNCIAS

REFERÊNCIAS

Alavarce RA, Saldanha LL, Almeida NL, Porto VC, Dokkedal AL, Lara VS. The Beneficial Effect of *Equisetum giganteum* L. against *Candida* Biofilm Formation: New Approaches to Denture Stomatitis. Evid Based Complement Alternat Med. 2015:e939625.

Alavarce RAS. Fitoterápico *Equisetum giganteum* e estomatite protética: estudo da ação antimicrobiana, antiaderente e anti-inflamatória contra *Candida albicans*, e potencial citotóxico sobre células epiteliais do palato humano [Mestrado]. Bauru: Faculdade de Odontologia de Bauru; 2014.

Alberts B, Johnson A, Lewis J, Raff M, Roberts K, Walter P. Molecular biology of the cell. 5. ed. New York: Garland Science, 2010. 1725 p.

Almeida NLM. *Equisetum giganteum* e *Punica granatum* Linné associados a adesivo protético: atividade antimicrobiana contra biofilms de *Candida albicans*. [Mestrado]. Bauru: Faculdade de Odontologia de Bauru; 2016.

Almqvist S, Werthén M, Johansson A, Tornqvist T, Agren MS, Thomsen P. Evaluation of a near-senescent human dermal fibroblast cell line and effect of amelogenin. Br. J. Dermatol; 2009;160(6); 1167-1171.

Alves PM, Queiroz LM, Pereira JV, Pereira Mdo S. *In vitro* antimicrobial, antiadherent and antifungal activity of Brazilian medicinal plants on oral biofilm microorganisms and strains of the genus *Candida*. Rev Soc Bras Med Trop. 2009;42:222-4.

Anibal PC, Peixoto IT, Foglio MA, Hoflihg JF. Antifungal activity of the ethanolic extracts of *Punica granatum* L. and evaluation of the morphological and structural modifications of its compounds upon the cells of *Candida* spp. Braz J Microbiol. 2013;44(3):839-48.

Arantes AA, Prado J, Ranal MA. Licófitas e Samambaias da Estação Ecológica do Panga, Uberlândia, MG, Brasil: Equisetaceae, Lycopodiaceae e chavepara as famílias. Hoehnea. 2010;37:107-15.

Auty, MAE, Gardiner GE, Mc Brearty SJ, Ross O'Sullivan EO, Mulvihill DM, Collins JK, Fitzgerald GF, Stanton C, Ross RP. RP. Direct In Situ Viability Assessment of Bacteria in Probiotic Dairy Products Using Viability Staining in Conjunction with Confocal Scanning Laser Microscopy. Appl Environ Microbiol. 2001;67(1):420-5.

Badke MR, Budó MLD, Silva FM, Ressel LB. Medicinal plants: the knowledge sustained by daily life practice. *Esc Anna Nery*. 2011;15(1):132-139.

Banerjee A, Dasgupta N, De, B. *In vitro* study of antioxidant activity of *Syzygium cumini* fruit. *Food Chemistry*. 2005;90(4):727-733.

Batista JM, Birman EG, Cury AE. Suscetibilidade a antifúngicos de cepas de *Candida albicans* isoladas de pacientes com estomatite protética. *Rev Odontol Univ São Paulo*. 1999;13(4):343-348.

Benzi G, Ceci A. Herbal Medicines in European Regulation. *Pharmacological Research*. 1997;35(5):355-62.

Bernardo THL, Veríssimo RCSS, Alvino V, Araujo MGS, Santos RFEP, Viana MDM, Bastos MLA, Moreira MSAM, Junior JXA. Antimicrobial analysis of an antiseptic made from ethanol crude extracts of *P. granatum* and *E. uniflora* in *Wistar* Rats against *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus epidermidis*. *Scientific World Journal*. 2015:e751791.

Berns KI, Bond EC, Manning FJ. Institute of Medicine (US) Committee on Resource Sharing in Biomedical Research. Washington (DC): [National Academies Press \(US\)](#); 1996.

Bin-Hafeez B, Haque R, Parvez S, Pandey S, Sayeed I, Raisuddin S. Immunomodulatory effects of fenugreek (*Trigonella foenum graecum* L.) extract in mice. *Int Immunopharmacol*. 2003; 3(2):257-265.

Bizerra FC, Nakamura CV, de Poersch C, Estivalet Svidzinski TI, Borsato Quesada RM, Goldenberg S, Krieger MA, Yamada-Ogatta SF. Characteristics of biofilm formation by *Candida tropicalis* and antifungal resistance. *FEMS Yeast Res*. 2008;8(3):442-50.

Blumenthal M, Goldberg A, Brinckmann J. Herbal Medicine. Expanded commission e monographs. 3.ed. Newton, MA: *Integrative Medicine Communications*; 2000. p. 519.

Boss WK, Usal H, Chernoff G, Keller GS, Lask GP, Fodor PB. Autologous cultured fibroblasts as cellular therapy in plastic surgery. *Clin Plast Surg*. 2000;27:613–26.

Boulos L, Prevost M, Barbeau B, Coallier J, Desjardins R. LIVE/DEAD BacLight: application of a new rapid staining method for direct enumeration of viable and total bacteria in drinking water. *J. Microbiol. Methods*. 1999;37(1); 77–86.

Braga R. Plantas do nordeste - Especialmente do Ceará. 1.ed. Rio Grande do Norte: Editora Universitária, 1961. 540p.

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

Budtz-Jorgensen E. Clinical aspects of *Candida* infection in denture wearers. The Journal of the American Dental Association. 1978;96(3):474-479.

Cáceres A, Girón LM, Martínez AM. Diuretic activity of plants used for the treatment of urinary ailments in Guatemala. J. Ethnopharmacol. 1987;19(3):233-45.

Calixto JB. Efficacy, safety, quality control, marketing and regulatory guidelines for herbal medicines (phytotherapeutic agents). Braz J Med Biol. 2000;33(2):179-89.

Carneiro DM, Freire RC, Honório TCD, Zoghaib I, Cardoso, FFSS, Tresvenzol MF, Paula JR, Sousa ALL, Jardim PCBV, Cunha LC. Randomized, Double-Blind Clinical Trial to Assess the Acute Diuretic Effect of *Equisetum arvense* (Field Horsetail) in Healthy Volunteers. Evid Based Complement Alternat Med. 2014:e 760683.

Catalán A, Pacheco JG, Martínez A, Mondaca MA. *In vitro* and *in vivo* activity of *Melaleuca alternifolia* mixed with tissue conditioner on *Candida albicans*. Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod. 2008;105(3):327-32.

Cavalcanti BC, Costa-Lotufo LV, Moraes MO, Burbano RR, Silveira ER, Cunha, KMA et al. Genotoxicity evaluation of kaurenoic acid, a bioactive diterpenoid present in Copaiba oil. Food Chem Toxicol. 2006;44:388–92.

Chandra J, Mukherjee PK, Leidich SD, Faddoul FF, Hoyer LL, Douglas LJ, Ghannoum MA. Antifungal resistance of candidal biofilms formed on denture acrylic *in vitro*. J Dent Res. 2001;80(3):903-8.

Chavrier C, Hartmann DJ, Couble ML, Herbage D. Distribution and organization of the elastic system fibres in healthy human gingiva. Ultrastructural and immunohistochemical study. Histochemistry. 1988;89:47–52.

Choi YM, Noh DO, Cho SY, Suh HJ, Kim KM, Kim JM 2006. Antioxidant and antimicrobial activities of propolis from several regions of Korea. Food Science and Technology. 2006;39(7):756-761.

Chung VQ, Tattersall M, Cheung HTA. Interactions of a herbal combination that inhibits growth of prostate cancer cells. Cancer Chemotherapy and Pharmacology.

2004;53:384-390.

Coura GS, Zórtea AJJ, Savi LA, Simões CMO, Magini RS. Protocolo preliminary de cultura de fibroblastos gengivais humanos. Rev Bas Implantodont Prótese implant. 2005;12(47/48):190-6.

Crescenti A, Puiggròs F, Colomé A, Poch JA, Caimari A, Josep Bas JM, Boqué N, Arola L. Antiurolithiasic effect of a plant mixture of *Herniaria glabra*, *Agropyron repens*, *Equisetum arvense* and *Sambucus nigra* (Herbensurina®) in the prevention of experimentally induced nephrolithiasis in rats. Arch. Esp. Urol. 2015;68(10):739-749.

Da Silva PM, Acosta EJ, Pinto Lde R, Graeff M, Spolidorio DM, Almeida RS, Porto VC. Microscopical analysis of *Candida albicans* biofilms on heat-polymerised acrylic resin after chlorhexidine gluconate and sodium hypochlorite treatments. Mycoses. 2011;54(6):e712-7.

De Mello WC. Heart failure: how important is cellular sequestration? The role of the renin-angiotensin-aldosterone system. J Mol Cell Cardiol. 2004;37:431-8.

Einbond L, Reynertson KA, Luo XD, Basile MJ, Kennelly EJ. Anthocyanin antioxidant from edible fruits. Food Chemistry. 2004;84(1):23-28.

Endo EH, Cortez DA, Ueda-Nakamura T, Nakamura CV, Dias Filho BP. Potent antifungal activity of extracts and pure compound isolated from pomegranate peels and synergism with fluconazole against *Candida albicans*. Res Microbiol. 2010;161(7):534-4.

Erdag G, Sheridan RL. Fibroblasts improve performance of cultured composite skin substitutes on athymic mice. Burns. 2004;30(4):322-8.

European Commite For Antimicrobial Susceptibility Testing of the European Society of Clinical Medical Infectious, D. Eucast. Definitive Document. Determination of minimum inhibitory concentrations (MICs) of antimicrobials agents by agar dilution. Clin Microbial Infect. 2000;6(9):509-15.

Farinon M, Lora PS, Francescato LN, Bassani VL, Henriques AT, Xavier RM, Oliveira PG. Effect of Aqueous Extract of Giant Horsetail (*Equisetum giganteum* L.) in Antigen-Induced Arthritis. Open Rheumatol J. 2013;7:129–133.

Fidalgo TKS, Barcelos R, Petrópolis DB, Azevedo B, Primo LG, Silva Silho FC. Citotoxicidade de diferentes tipos de concentrações de hipoclorito de sódio sobre osteoblastos humanos. RGO. 2009;57:317-21.

Fisher PE, Ward A. Complementary Medicine in Europe. British Medical Journal. 1994;309(9):107-11.

Freshney RI, Liss AR. Culture of animal cells: a manual of basic technique. 2.ed. New York: Willy-Liss; 1987.

Freshney RI, Liss AR. Culture of animal cells: a manual of basic technique. 5.ed. New York: Willy-Liss; 2005.

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

Fundação Oswaldo Cruz. [Centro de Informação Científica e Tecnológica]. Sistema Nacional de Informações Tóxico-Farmacológicas (FIOCRUZ/CICT/SINITOX). Medicamentos. 2015. Disponível em: <http://www.fiocruz.br/sinitox/medicamentos.htm>.

Ganguly S, Mitchell AP. Mucosal biofilms of *Candida albicans*. Curr. Opin. Microbiol. 2011;14(4):380–385.

Generics Home Reference. Fibroblast. 2011. Disponível em: <http://ghr.nlm.nih.gov/glossary=fibroblast>.

Gorzalczany S, Rojo A, Rondina RVD, Debenedetti SL, Acevedo MCD. Estudo de toxicidade aguda por via oral de plantas medicinais argentinas. Acta Farm Bonaerense. 1999;18:221-4.

Guzmán NER, Infante, JAG, Laredo, RFG, Camacho, RR, Gomez MR, Gasca TG, Muñoz, ER, Maldonado SHG, Torres LM, García BAJ. Antioxidant activity and genotoxic effect on HeLa cells of phytophenolic compounds from infusions of *Quercus resinosa* leaves. Food Chemistry. 2009;115:1320-1325.

Hansen MB, Nielsen SE, Berg K. Re-examination and further development of precise and rapid dye method for measuring cell growth cell/cell kill. J Immunol Methods. 1989;119:203-10.

Hawkins D, Abrahamse H. Laboratory methods for evaluating the effect of low level laser therapy (LLLT) in wound healing. African Journal of Biomedical Research. 2005; 8(1):1–14.

Hayon T, Dvilansky A, Shpilberg O, Nathan I. Appraisal of the MTT-based assay as useful tool for predicting drug chemosensitivity in leukaemia. Leukaemia Lymphoma.

2003;44(11):1957–62.

Hoit BD. Left ventricular diastolic function. Crit Care Med. 2007;35:S340–7.

Hostettmann K, Queiroz, EF, Vieira PC. Princípios Ativos de Plantas Superiores. São Carlos: EduSCar; 2003. 152p.

Huang X, Kojima-Yuasa A, Xu, S, Norikura, T, Kennedy, DO, Hasuma T, Matsui-Yuasa I. Green tea extract enhances the selective cytotoxic activity of *Zizyphus jujuba* extracts in HepG2 cells. American Journal of Chinese Medicine. 2008;36;729-744.

Institute of Medicine (US) Committee on Resource Sharing in Biomedical Research; Berns KI, Bond EC, Manning FJ, editors. Washington (DC): [National Academies Press \(US\)](#); 1996.

International Standard ISO 10993-5. Biological evaluation of medical devices-Part 5: Tests for *in vitro* cytotoxicity. Geneva: International Organization for Standardization, 2009.

Jabbar SAB, Twentyman PR, Watson JV. The MTT Assay underestimates the growth inhibitory effects of interferons. Br J Cancer. 1989; 60:523-8.

Johnson HJ, Northup SJ, Seagraves PA, Garvin PJ, Wallin RF. Biocompatibility test procedures for materials evaluation *in vitro*. I. Comparative test system sensitivity. J Biomed Mater Res. 1983;17:571–586.

Jurenka J. Therapeutic applications of pomegranate (*Punica granatum* L.): a review. Alternative Medicine Review. 2008;13(2):128–144.

Kennedy DA, Lupattelli A, Koren G, Nordeng H. Herbal medicine use in pregnancy: results of a multinational study. 2013;13:355.

Kimber I, Dearman RJ. Factors affecting the development of food allergy. Proc Nutr Soc. 2002;61(4):435-9.

Kloucek P, Polesny Z, Svobodova B, Vlkova E, Kokoska L. Antibacterial screening of some Peruvian medicinal plants used in Calleria District. J Ethnopharmacol. 2005;99(2):309-12.

Kueng W, Silber E, Eppenberger U. Quantification of cells cultured on 96-well plates.

Anal Biochem. 1989;182(1):16-9.

Kulak YO, Arikan A, Kazazoglu E. Oral hygiene habits, denture cleanliness; presence of yeasts and stomatitis in elderly people. J Oral Rehabil. 2002;29(1):300-304.

Kwak JH, Kang MW, Roh JH, Choi SU, Zee OP. Cytotoxic phenolic compounds from *Chionanthus retusus*. Archives of Pharmacal Research. 2009;32(12):1681-1687.

Langley P. Why a pomegranate? Brit Med J. 2000;321(4):1153-4.

Lansky EP, Newman RA. *Punica granatum* (pomegranate) and its potential for prevention and treatment of inflammation and cancer. J. Ethnopharmacol. 2007;109(2):177-206.

Lapa AJ, Souccar C, Landman MTRL, Godinho RO, Lima TCM. Farmacologia e Toxicologia De Produtos Naturais. In: Simões CMO, Schenkel EP, Gosmann GM, Mello JCP, Mentz LA, Petrovick PR. Farmacognosia: Da Planta Ao Medicamento. Porto Alegre: Ufrgs; 2007. p. 247- 262.

Leal DP, Isla MI, Vattuone MA, Sampietro AR. A hysteretic invertase from *Equisetum giganteum* L. Phytochemistry. 1999; 52:1009-16.

Leask A. TGF- β , cardiac fibroblasts, and the fibrotic response. Cardiovasc Res. 2007; 74:207-12.

Lemos MMC, Miranda JL, Souza MSGS. Estudo clínico, microbiológico e histopatológico da estomatite por dentadura. Rev Bras Patol Oral. 2003;2(1):3-10.

Lodish H, Berk A, Kaise CA, Bretscher A, Ploegh H, Amon A. Biologia Celular e Molecular. 7ed. Artmed Editora; 2014. 1244p.

Lorenzi H, Souza HM. Plantas ornamentais no Brasil: arbustivas, herbáceas e trepadeiras. 3.ed. São Paulo: Nova Odessa; 2001. 425p.

Malvezzi CK. Atividade antimicrobiana de produtos naturais para obtenção de novos biofármacos: estudo dos extratos brutos e suas associações. [Doutorado]. Lorena: Escola de Engenharia de Lorena; 2010.

Manson RJ, Shannnon JM. Alveolar type II cells. In: Crystal RG, West JB, Weibel ER, Barnes PJ, editors. The lung. Philadelphia: Lippincott-Raven; 1997:543-55.

- Mansourian A, Boojarpour N, Ashnagar S, Momen Beitollahi J, Shanshiri AR. The comparative study of antifungal activity of *Syzygium aromaticum*, *Punica granatum* and nystatin on *Candida albicans*; an *in vitro* study. J Mycol Med. 2014; 24(4):63-8.
- Mehta PK, Griendling KK. Angiotensin II cell signaling: physiological and pathological effects in the cardiovascular system. Am J Physiol Cell Physiol. 2007;292(1):C82-97.
- Menezes SMS, Pinto DM, Cordeiro LN. Atividades biológicas *in vitro* e *in vivo* de *Punica granatum* L. romã). Revista Brasileira de Medicina. 2008;65(11): 388-391.
- Miguel MD, Miguel GO. Desenvolvimento de fitoterápicos. 1.ed. São Paulo: Robe; 1999. 115p.
- Mohire NC, Yadav AV. Chitosan-based polyherbal toothpaste: as novel oral hygiene product. Indian J Dent Res. 2010;21:380-4.
- Morales MM. Métodos Alternativos à utilização de animais em pesquisa científica: Mito ou realidade? 1.ed. São Paulo: Ciência e Cultura; 2008.
- Mosmann T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. Journal of immunological methods 1983;65(1-2):55-63.
- Naqvi SAH, Khan MSY, Vohora SB. Anti-bacterial, anti-fungal and anthelmintic investigations on indian medical plants. Rev Fitoterapia. 1991;62: 221-228.
- Natarajan M, Mohan S, Martinez BR, Meltz ML, Herman TS. Antioxidant compounds interfere with the 3-[4,5- dimethylthiazol-2-yl]-2, 5-diphenyltetrazolium bromide cytotoxicity assay. Cancer Detection and Prevention. 2000; 24:405-414.
- Neurath AR, Strick N, Li YY, Debnath AK. *Punica granatum* (Pomegranate) juice provides an HIV-1 entry inhibitor and candidate topical microbicide. BMC Infectious Diseases. 2004;4:41.
- Newton AV. Denture sore mouth. A possible etiology. British Dental Journal. 1962;112:357-360.
- Nicoletti MA, Junior MAO, Bertasso CC, Caparossi PY, Tavares APL. Principais interações no uso de medicamentos fitoterápicos. Infarma. 2007;19(1-2): 32-38.
- Nicoletti MA. Administração de medicamentos contendo drogas de origem vegetal e
-

de plantas medicinais - importância da orientação correta para seu uso racional. Rev. Bras. Farm. 2009; 90(3):264-271.

Oliveira LD. Cytotoxicity of Brazilian plant extracts against oral microorganisms of interest to dentistry. BMC Complementary and Alternative Medicine. 2013;13:208.

Oliveira TER, Frigerio MLMA, Yamada MCM, Birman EG. Avaliação da estomatite protética em portadores de próteses totais. Pesq Odontol Brás. 2000;14(3): 219-224.

Palhares RM, Drummond MG, Brasil BSAF, Cosenza GP, Brandão MGL, Oliveira G. Medicinal Plants Recommended by the World Health Organization: DNA Barcode Identification Associated with Chemical Analyses Guarantees Their Quality. PLoS One. 2015;10(5):e0127866.

Pavan S, dos Santos PH, Filho JN, Spolidorio DM. Colonisation of soft lining materials by micro-organisms. Gerodontology. 2010;27(3):211-6.

Pereira ERT, Paula JR, Valadares MC. Investigação do potencial quimioprotetor da *Punica granatum*. Rev Eletrônica de Farmácia. 2005;2(2):168-171.

Pérez Gutiérrez RM, Laguna GY, Walkowski A. Diuretic activity of Mexican equisetum. J Ethnopharmacol. 1985;14:269-72.

Piaia L. Atividade metabólica de fibroblastos humanos dermais cultivados em membranas de celulose bacteriana compostas com Aloe vera. In: Anais do XX Congresso Brasileiro de Engenharia Química, 2014; Florianópolis. Florianópolis: COBEQ. p.1-8.

Prashanth D, Asha MK, Amit A. Antibacterial activity of *Punica granatum*. Fitoterapia; 72:171-173.

Prista LN. Tecnologia farmacêutica. 4.ed. Lisboa: Fundação Calouste Gulbenkian, 1995; 3v.

Ramage G, Saville SP, Thomas DP, Lopez- Ribot JL. *Candida* biofilms: an update. Eukaryot Cell. 2005;4(4): 633-8.

Ramage G, Vandewalle K, Wickes BL, López-Ribot JL. Characteristics of biofilm formation by *Candida albicans*. Rev Iberoam Micol. 2001;18(4):163-70.

Ramalingum N, Mahomoodally MF. The therapeutic Potential of Medicinal Foods.

Journal List Adv Pharmacol Sciv. 2014;2014:e354264.

Ramos JFR. Determinação de parâmetros cinéticos de Biofilmes formados por *Pseudomonas fluorescens*. [Mestrado]. Porto: Universidade do Porto; 2008.

Rothwell GW. Pteridophytic evolution: an often under appreciated phytological success story. Review of Palaeobotany and Palynology. 1996;90:209–222.

Rummum N, Somanah J, Ramsaha S, Bahorun T, Bhujun VSN. Bioactivity of Nonedible Parts of *Punica granatum* L.: A Potential Source of Functional Ingredients. Int J Food Sciv. 2013; 2013:e602312.

Saldanha LL. Prospecção química e avaliação das atividades e alelopática de *Myrciabella Cambess*. Dissertação [Mestrado]. Botucatu: Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, Instituto de Biociências de Botucatu; 2013.

Sato JD, Hayashi I, Hayashi J, Hoshi H, Kawamoto T, Mckeehan WL, Matsuda R, Matsuzaki K, Mills KHG, Okamoto T, Serrero G, Sussman DJ, Kan M. Specific cell types and the requirements. In: Davis, J.M. (1.ed.). Basic cell culture: A practical approach. New York: Oxford University Press; 1994. p.181-222.

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

Seddon M, Looi YH, Shah AM. Oxidative stress and redox signalling in cardiac hypertrophy and heart failure. Heart. 2007;93:903–7.

Seeram NP, Adams LS, Henning SM, Niu Y, Zhang Y, Nair MG, et al. *In vitro* antiproliferative, apoptotic and antioxidant activities of punicalagin, ellagic acid and a total pomegranate tannin extract are enhanced in combination with other polyphenols as found in pomegranate juice. J Nutr Biochem. 2005;16(6):360-7.

Serafin C, Nart V, Malheiros A, Cruz AB, Monache FD, Gette MA, Zacchino S, Cechinel Filho V. Avaliação do potencial antimicrobiano de *Pliniaglomerata* (Myrtaceae). Revista Brasileira Farmacognosia. 2007;17: 578-582.

Sheets MD, Du Bois ML, Williamson JG. The pomegranate. In: Horticultural Sciences Department. Miami: Florida Cooperative Extension Service. Institute of food and Agricultural Sciences. University of Florida; 2004. Disponível em: <http://edis.ifas.ufl.edu/pdf/FILES/MG/MG05600.pdf>.

Shoemaker M, Cohen I, Campbell M. Reduction of MTT by aqueous herbal extracts in

the absence of cells. Journal of Ethnopharmacology. 2004;93:381–384.

Sieuwert AM, Klijn JG, Peters HA, Foekens JA. The MTT tetrazolium salt assay scrutinised: how to use this assay reliably to measure metabolic activity of cell cultures *in vitro* for the assessment of growth characteristics, IC50 values and cell survival. Eur J Clin Chem Biochem. 1995;33:813–23.

Simões CMO, Schenkel EP. A pesquisa e a produção brasileira de medicamentos a partir de plantas medicinais: a necessária interação da indústria com a academia. Revista brasileira de farmacognosia. 2002;12(1):35-40.

Simões CMO. Farmacognosia: da planta ao medicamento. 4.ed. Florianópolis: Ed.UFSC, 2002.

Stoddart MJ, Mammalian Cell Viability Methods and Protocols. 2.ed. New York: Humana Press, 2011; 1v.

Tamaki M, Imazeki Y, Shirane A, Fujinuma K, Shindo M, Kimura M, Uchida Y. Novel gratisin derivatives with high antimicrobial activity and low hemolytic activity. Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters. 2011;21:440-443.

Tanner JH, Yamauchi M, Simpson DM. Collagen cross-linking in bovine gingiva. Arch Oral Biol. 1991;36(2):111–115.

Tonder AV, Joubert AM, Cromrty AD. Limitations of the 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl-2H-tetrazolium bromide (MTT) assay when compared to three commonly used cell enumeration assays. BMC Res Notes. 2015;8:47.

Uludamar A, Özyeşil AG, Ozkan YK. Clinical and microbiological efficacy of three different treatment methods in the management of denture stomatitis. Gerodontology. 2011;28(2):104-10.

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

Villalba RG, Espín JC, Aaby K, Alasalvar C, Heinonen M, Jacobs G, Voorspoels S, Koivumäki T, Kroon PA, Pelvan E, Saha S, Barberán FAT. Validated Method for the Characterization and Quantification of Extractable and Nonextractable Ellagitannins after Acid Hydrolysis in Pomegranate Fruits, Juices, and Extracts. J Agric Food Chem. 2015;63(29):6555-66 .

Werkman C, Granato DC, Kerbauy WD, Sampaio FC, Brandão AAH, Rode SM. Aplicações terapêuticas da *Punica granatum* L. (romã). Rev. Bras PI Méd. 2008;10(3):104-11.

Wiegand C, Hipler CU. Methods for the measurement of cell and tissue compatibility including tissue regeneration processes. GMS Krankenhhyg Interdiszip. 2008;3(1):Doc12.

Wolfe K, Wu X, Liu RH. Antioxidant activity of apple peels. Journal of Agricultural and Food Chemistry. 2003;51(3):609-614.

Xie Z, Thompson A, Kashleva H, Bagtzoglou AD. A quantitative real-time RT-PCR assay for mature *C. albicans* biofilms. BMC Microbiol. 2011;11:93.

Yer VR, Elisen MB, Ross DT, Schuler G, Moore T, Lee JCF, et al. The transcriptional program in the response of human fibroblasts to serum. Science. 1999;283(5398):83-87.

Zarfeshany A, Asgary S, Javanmard SH. Potent health effects of pomegranate. Adv Biomed Res. 2014;3:100.

Zhang X. [World Health Organization]. Regulatory situation of herbal medicines; A world wide review. Geneva. WHO. 1998;45:1-45.