



UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARÁ  
INSTITUTO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

**EXTRATOS DE *Pyrostegia venusta*: CARACTERIZAÇÃO  
FÍSICO-QUÍMICA, CAPACIDADE IMUNOMODULADORA E  
PREVENÇÃO DA FORMAÇÃO DO BIOFILME DENTAL**

Mayara Brito de Sousa

BELÉM - PA

2013



UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARÁ  
INSTITUTO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

**EXTRATOS DE *Pyrostegia venusta*: CARACTERIZAÇÃO  
FÍSICO-QUÍMICA, CAPACIDADE IMUNOMODULADORA E  
PREVENÇÃO DA FORMAÇÃO DO BIOFILME DENTAL**

Autora: Mayara Brito de Sousa

Orientador: Prof. Dr. Francisco Martins Teixeira

Co-orientador: Prof. Dr. José Otávio Carréra Silva Júnior

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, área de concentração: Fármacos e Medicamentos, do Instituto de Ciências da Saúde da Universidade Federal do Pará para obtenção do título de mestre em Ciências Farmacêuticas.

BELÉM-PA

2013

## **DEDICATÓRIA**

Dedico este trabalho aos meus pais, Iris e Auxiliadora, com todo o meu amor e gratidão por tudo o que fizeram por mim ao longo da minha vida.

## **AGRADECIMENTOS**

A Deus, acima de tudo, pelo dom da vida e pela oportunidade de estar realizando mais um sonho.

Aos meus pais, Iris e Auxiliadora, por todo amor, dedicação, exemplo, incentivo e apoio dispensados de forma incondicional. Vocês são meu maior exemplo e eu me sinto privilegiada de ter como pais dois professores e, acima de tudo, educadores.

A minha irmã Adriana, meu cunhado Fábio e meus sobrinhos Isabela e Davi pelo carinho e apoio demonstrados em todos os momentos.

Ao meu namorado e amigo Heitor Ribeiro da Silva pela força, carinho, paciência, incentivo e companheirismo indispensáveis em todas as etapas deste trabalho.

Ao meu orientador Prof. Dr. Francisco Martins Teixeira pelo apoio, incentivo, paciência e confiança durante esses dois anos de mestrado. Admiro muito sua integridade, bondade e respeito com seus alunos.

Ao Prof. Dr. José Otávio Carréra Silva Júnior, meu co-orientador, e ao Prof. Dr. Wagner Luiz Ramos Barbosa pela confiança, incentivo e pelas valiosas oportunidades concedidas.

Ao Prof. Dr. João Carlos Palazzo de Mello e ao Prof. Dr. Celso Vataru Nakamura por terem me recebido na Universidade Estadual de Maringá (UEM). Agradeço também pela orientação e pela relevante contribuição científica na realização deste trabalho.

À Profa. Dra. Ana Cláudia Braga Amoras Alves pela amizade e pela importante contribuição científica na análise microbiológica.

Aos colegas do mestrado e da graduação Adreanne, Ana Paula, Andressa, Andriele, Andreza, Bianca, Érika, Joefferson, Karla e Myrth pela amizade e por compartilhar conhecimentos e experiências.

Aos técnicos Jailton (Fitoquímica) e Marinete (Microbiologia) pela paciência e atenção dispensados durante os experimentos.

Às secretárias da pós-graduação Brasília e Cliciane pela atenção e boa vontade dispensados a todo instante.

À Universidade Federal do Pará e ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas (PPGCF), pela oportunidade de aprendizado e crescimento profissional.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pela concessão da bolsa de mestrado.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela concessão do auxílio-moradia.

Enfim, a todas as pessoas que de alguma forma contribuíram para a realização deste trabalho, meus sinceros agradecimentos.

*“A mente que se abre a uma nova ideia jamais voltará ao seu tamanho original”.*

*Albert Einstein*

## RESUMO

A espécie *Pyrostegia venusta* é uma liana trepadeira popularmente conhecida como flor-de-São-João. É utilizada na medicina popular para o tratamento de diversas doenças. Na literatura científica, vários compostos bioativos já foram isolados e algumas atividades biológicas importantes, como a atividade antimicrobiana e imunomoduladora, já foram atribuídas a esta espécie. A cárie e a doença periodontal são as doenças bucais mais prevalentes na população brasileira, sendo o biofilme dental o seu fator etiológico primário. A candidíase oral ocorre devido à infecção por espécies do gênero *Candida* que, em determinadas situações, podem se comportar como patógenos oportunistas. O objetivo deste trabalho foi realizar um estudo físico, químico e biológico da espécie vegetal *Pyrostegia venusta* e investigar seu potencial na prevenção das principais doenças bucais. Foram realizados ensaios de citotoxicidade do extrato bruto e frações em células mononucleares do sangue periférico e em macrófagos murinos. Para avaliar a atividade imunomoduladora do extrato bruto e frações, foi realizada dosagem de óxido nítrico (NO) produzido por macrófagos estimulados com lipopolissacarídeo (LPS). Foi realizado ensaio de microdiluição em caldo para determinar a concentração inibitória mínima (CIM), concentração bactericida mínima (CBM) e concentração fungicida mínima (CFM) do extrato bruto, frações e marcadores. Também foram avaliados o efeito na inibição da aderência de *Streptococcus mutans* em lamínula de vidro, o efeito na redução do pH e a capacidade de inibição do brotamento de *Candida albicans* do extrato bruto e frações. A espécie *Pyrostegia venusta* não foi citotóxica em baixas concentrações. A produção de NO foi inibida pelas frações acetato de etila e n-butanólica. O extrato bruto, frações e marcadores apresentaram atividade antimicrobiana contra *Streptococcus mutans*, *Streptococcus mitis*, *Streptococcus oralis* e *Candida albicans*, capacidade de inibição da aderência e redução do pH. O extrato bruto e frações hexânica, acetato de etila e n-butanólica apresentaram capacidade de inibição do brotamento. A espécie *Pyrostegia venusta* pode ser uma alternativa na prevenção e tratamento das principais doenças bucais. No entanto, mais estudos são necessários antes de considerá-la realmente promissora.

**Palavras-chave:** *Pyrostegia venusta*; biofilme dental; atividade imunomoduladora, atividade antimicrobiana.

## ABSTRACT

*Pyrostegia venusta* is a climbing plant popularly known as “flor-de-São-João”. In traditional medicine is used to treat various diseases. Within the scientific literature various bioactive compounds have been isolated and some important biological activities as antimicrobial e immunomodulatory activities have been attributed to this specie. Caries and periodontal disease are the most prevalent oral pathologies among Brazilian population and dental biofilm is the main etiological factor of these diseases. Oral candidiasis is an infection caused by species of the yeast *Candida* which in some cases may behave as opportunistic pathogens. The aim of this study was to evaluate the physical, chemical and biological aspects of *Pyrostegia venusta* and its potential in the prevention of the main oral diseases. It was evaluated the cytotoxicity of the crude extract and its fractions in peripheral blood mononuclear cells and murine macrophages. The immunomodulatory activity of the crude extract and its fractions was verified through the dosage of nitric oxide (NO) production by macrophages murines stimulated with lipopolysaccharide (LPS). Through broth microdilution assay it was determined the minimal inhibitory concentration (MIC), minimal bactericidal concentration (MBC) and minimal fungicidal concentration (MFC) of the crude extract, fractions and isolated compounds. It was also evaluated the inhibition of *Streptococcus mutans* adherence to a glass cover slip, pH reduction capacity and the effect on germ-tube formation and budding of *Candida albicans* of the crude extract and its fractions. *Pyrostegia venusta* was not cytotoxic at low concentrations. NO production was inhibited by ethyl acetate and n-butanol fractions. Crude extract, fractions and isolated compounds have antimicrobial activity against *Streptococcus mutans*, *Streptococcus mitis*, *Streptococcus oralis* and *Candida albicans*; they also inhibited the adherence and were able to reduce the pH. Crude extract and hexane, ethyl acetate and n-butanol fractions inhibited the germ-tube formation and budding of *Candida albicans*. *Pyrostegia venusta* can be an alternative in prevention and treatment of the main oral diseases. However, other studies are necessary before it is considered as a promising specie.

**Key-words:** *Pyrostegia venusta*; dental biofilm; immunomodulatory activity; antimicrobial activity.

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Estrutura química do verbascosídeo .....	26
Figura 2: <i>Pyrostegia venusta</i> (Ker Gawl.) Miers .....	40
Figura 3: Exsicata da espécie <i>Pyrostegia venusta</i> (Ker Gawl.) Miers .....	43
Figura 4: Leitura das lâminas em microscópio óptico com objetiva 40x demonstrando células de <i>Candida albicans</i> sem brotamento (a) e com brotamento (b) .....	60
Figura 5: Distribuição granulométrica do pó de <i>Pyrostegia venusta</i> .....	62
Figura 6: Curvas TG e DTA do pó de <i>Pyrostegia venusta</i> .....	64
Figura 7: Curva DSC do pó de <i>Pyrostegia venusta</i> .....	65
Figura 8: Espectro na região do infravermelho do pó de <i>Pyrostegia venusta</i> .....	66
Figura 9: Rendimento em gramas e em porcentagem da partição líquido – líquido..	68
Figura 10: Curvas TG e DTA do extrato bruto liofilizado de <i>Pyrostegia venusta</i> .....	68
Figura 11: Curvas DSC do extrato bruto liofilizado de <i>Pyrostegia venusta</i> .....	69
Figura 12: Espectro na região do infravermelho do extrato bruto liofilizado de <i>Pyrostegia venusta</i> .....	70
Figura 13: Inibição da produção de NO por macrófagos murinos estimulados com LPS pelo extrato bruto, fração hexânica, fração acetato de etila, fração n-butanólica e fração aquosa de <i>Pyrostegia venusta</i> .....	73
Figura 14: Atividade antimicrobiana do extrato bruto (1), fração hexânica (2), fração acetato de etila (3), fração n-butanólica (4), fração aquosa (5) de <i>Pyrostegia venusta</i> contra <i>Streptococcus mutans</i> em diferentes concentrações na placa de 96 poços ..	75
Figura 15: Atividade antimicrobiana do extrato bruto (1), fração hexânica (2), fração acetato de etila (3), fração n-butanólica (4), fração aquosa (5) de <i>Pyrostegia venusta</i> contra <i>Streptococcus mitis</i> em diferentes concentrações na placa de 96 poços.....	76
Figura 16: Atividade antimicrobiana do extrato bruto (1), fração hexânica (2), fração acetato de etila (3), fração n-butanólica (4), fração aquosa (5) de <i>Pyrostegia venusta</i> contra <i>Streptococcus oralis</i> em diferentes concentrações na placa de 96 poços .....	77
Figura 17: Atividade antimicrobiana do extrato bruto (1), fração hexânica (2), fração acetato de etila (3), fração n-butanólica (4), fração aquosa (5) de <i>Pyrostegia venusta</i> contra <i>Candida albicans</i> em diferentes concentrações na placa de 96 poços .....	78
Figura 18: Atividade antimicrobiana dos marcadores acteosídeo (8) e $\beta$ -OH-verbascosídeo (9) de <i>Pyrostegia venusta</i> contra <i>Streptococcus mutans</i> em diferentes concentrações na placa de 96 poços .....	79
Figura 19: Atividade antimicrobiana dos marcadores acteosídeo (8) e $\beta$ -OH-verbascosídeo (9) de <i>Pyrostegia venusta</i> contra <i>Streptococcus mitis</i> em diferentes concentrações na placa de 96 poços .....	80

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Determinação de perda por dessecação e teor de cinzas totais do pó de <i>Pyrostegia venusta</i> (Ker Gawl.) Miers .....	63
Tabela 2: Perfil termogravimétrico do pó de <i>Pyrostegia venusta</i> .....	64
Tabela 3: Perfil de calorimetria exploratória diferencial do pó de <i>Pyrostegia venusta</i> .....	65
Tabela 4: Número de onda ( $\text{cm}^{-1}$ ) e suas respectivas ligações características no espectro da região do infravermelho para o pó de <i>Pyrostegia venusta</i> .....	66
Tabela 5: Determinação da densidade aparente, pH e teor de sólidos da tintura de <i>Pyrostegia venusta</i> (Ker Gawl) Miers .....	67
Tabela 6: Perfil termogravimétrico do extrato bruto liofilizado de <i>Pyrostegia venusta</i> .....	69
Tabela 7: Perfil de calorimetria exploratória diferencial do extrato bruto liofilizado de <i>Pyrostegia venusta</i> .....	69
Tabela 8: Número de onda ( $\text{cm}^{-1}$ ) e suas respectivas ligações características no espectro da região do infravermelho para o extrato bruto liofilizado de <i>Pyrostegia venusta</i> .....	70
Tabela 9: Prospecção química do extrato bruto (EB) de <i>Pyrostegia venusta</i> .....	71
Tabela 10: Avaliação da citotoxicidade do extrato bruto (EB), fração hexânica (FH), fração acetato de etila (FAE), fração n-butanólica (FNB) e fração aquosa (FAQ) de <i>Pyrostegia venusta</i> em células mononucleares do sangue periférico (PBMC).....	72
Tabela 11: Avaliação da citotoxicidade do extrato bruto (EB), fração hexânica (FH), fração acetato de etila (FAE), fração n-butanólica (FNB) e fração aquosa (FAQ) de <i>Pyrostegia venusta</i> em células RAW 264.7 pelo ensaio de MTT.....	72
Tabela 12: CIM e CBM do extrato bruto (EB), fração hexânica (FH), fração acetato de etila (FAE), fração n-butanólica (FB), fração aquosa (FAQ) de <i>Pyrostegia venusta</i> contra <i>Streptococcus mutans</i> em diferentes concentrações .....	74
Tabela 13: CIM e CBM do extrato bruto (EB), fração hexânica (FH), fração acetato de etila (FAE), fração n-butanólica (FB), fração aquosa (FAQ) de <i>Pyrostegia venusta</i> contra <i>Streptococcus mitis</i> em diferentes concentrações .....	75
Tabela 14: CIM e CBM do extrato bruto (EB), fração hexânica (FH), fração acetato de etila (FAE), fração n-butanólica (FB), fração aquosa (FAQ) de <i>Pyrostegia venusta</i> contra <i>Streptococcus oralis</i> em diferentes concentrações .....	76
Tabela 15: CIM e CFM do extrato bruto (EB), fração hexânica (FH), fração acetato de etila (FAE), fração n-butanólica (FB), fração aquosa (FAQ) de <i>Pyrostegia venusta</i> contra <i>Candida albicans</i> em diferentes concentrações .....	77
Tabela 16: CIM dos marcadores acteosídeo (A) e $\beta$ -OH-verbascosídeo (B) de <i>Pyrostegia venusta</i> contra <i>Streptococcus mutans</i> em diferentes concentrações ..	78
Tabela 17: CIM dos marcadores acteosídeo (A) e $\beta$ -OH-verbascosídeo (B) de <i>Pyrostegia venusta</i> contra <i>Streptococcus mitis</i> em diferentes concentrações.....	79

Tabela 18: CIM dos marcadores acteosídeo (A) e $\beta$ -OH-verbascosídeo (B) de <i>Pyrostegia venusta</i> contra <i>Streptococcus oralis</i> em diferentes concentrações .....	80
Tabela 19: CIM dos marcadores acteosídeo (A) e $\beta$ -OH-verbascosídeo (B) de <i>Pyrostegia venusta</i> contra <i>Candida albicans</i> em diferentes concentrações .....	81
Tabela 20: Avaliação da atividade antiaderente do extrato bruto (EB), fração hexânica (FH), fração acetato de etila (FAE), fração n-butanólica (FNB) e fração aquosa (FAQ) de <i>Pyrostegia venusta</i> sobre <i>Streptococcus mutans</i> .....	82
Tabela 21: Efeito do extrato bruto (EB), fração hexânica (FH), fração acetato de etila (FAE), fração n-butanólica (FNB) e fração aquosa (FAQ) de <i>Pyrostegia venusta</i> no brotamento de <i>Candida albicans</i> .....	84

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
ATCC	<i>American Type Culture Collection</i>
CBM	Concentração Bactericida Mínima
CIM	Concentração Inibitória Mínima
CPO	Cariados, Perdidos e Obturados
DSC	Calorimetria Exploratória Diferencial
DTA	Análise Térmica Diferencial
FIOCRUZ	Fundação Osvaldo Cruz
IL-1	Interleucina 1
IL-1 $\beta$	Interleucina 1 Beta
IL-6	Interleucina 6
IL-8	Interleucina 8
INCQS	Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde
IV	Infravermelho
NO	Óxido Nítrico
OMS	Organização Mundial da Saúde
TG	Termogravimetria
TNF- $\alpha$	Fator de Necrose Tumoral Alfa
UFC	Unidades Formadoras de Colônias

## LISTA DE SÍMBOLOS E UNIDADES

$\alpha$	alfa
$\beta$	beta
$\Delta H$	variação de entalpia
cm	centímetro
mm	milímetro
$\mu\text{m}$	micrometro
g	grama
mg	miligrama
$\mu\text{g}$	micrograma
mL	mililitro
$\mu\text{L}$	microlitro
$^{\circ}\text{C}$	graus Celsius
$\mu\text{M}$	micromolar
rpm	rotação por minuto
min	minuto
kJ	quiloJoule

## SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO .....	18
2 REVISÃO DE LITERATURA .....	21
2.1 Família Bignoniaceae .....	22
2.1.1 <i>Pyrostegia venusta</i> (Ker Gawl.) Miers .....	23
2.1.2 VERBASCOSÍDEO/ACTEOSÍDEO .....	25
2.2 Biofilme dental e as doenças bucais .....	27
2.2.1 A HIPÓTESE DA PLACA ECOLÓGICA .....	30
2.3 Atividades Biológicas .....	32
2.3.1 ATIVIDADE ANTIMICROBIANA .....	32
2.3.2 ATIVIDADE IMUNOMODULADORA .....	34
3 OBJETIVOS .....	37
3.1 Geral .....	38
3.2 Específicos .....	38
4 MATERIAL E MÉTODOS .....	39
4.1 Material .....	40
4.1.1 MATÉRIA-PRIMA VEGETAL .....	40
4.1.2 REAGENTES E SOLUÇÕES .....	41
4.1.3 EQUIPAMENTOS .....	41
4.2 Métodos .....	42
4.2.1 OBTENÇÃO DO MATERIAL VEGETAL .....	42
4.2.2 IDENTIFICAÇÃO DO MATERIAL VEGETAL .....	43
4.2.3 PROCESSAMENTO DO MATERIAL VEGETAL .....	43
4.3 Caracterização física e química do pó de <i>Pyrostegia venusta</i> (Ker Gawl.) Miers .....	44
4.3.1 DETERMINAÇÃO DA DISTRIBUIÇÃO GRANULOMÉTRICA .....	44
4.3.2 DETERMINAÇÃO DA PERDA POR DESSECAÇÃO .....	44
4.3.3 DETERMINAÇÃO DO TEOR DE CINZAS TOTAIS .....	45
4.3.4 OBTENÇÃO DO PERFIL TÉRMICO DO PÓ DE <i>Pyrostegia venusta</i> (Ker Gawl.) Miers .....	45
4.3.4.1 Termogravimetria (TG) .....	45
4.3.4.2 Análise térmica diferencial (DTA) .....	46
4.3.4.3 Calorimetria exploratória diferencial (DSC) .....	46
4.3.5 OBTENÇÃO DO PERFIL ESPECTROSCÓPICO NA REGIÃO DO INFRAVERMELHO .....	46
4.4 Obtenção da tintura de <i>Pyrostegia venusta</i> (Ker Gawl.) Miers .....	46

4.5 Caracterização física e química da tintura de <i>Pyrostegia venusta</i> (Ker Gawl.) Miers .....	47
4.5.1 DETERMINAÇÃO DA DENSIDADE APARENTE .....	47
4.5.2 DETERMINAÇÃO DO pH .....	47
4.5.3 DETERMINAÇÃO DO TEOR DE SÓLIDOS .....	47
4.6 Obtenção do extrato bruto e frações de <i>Pyrostegia venusta</i> (Ker Gawl.) Miers .....	48
4.6.1 OBTENÇÃO DO PERFIL TÉRMICO DO EXTRATO BRUTO DE <i>Pyrostegia venusta</i> (Ker Gawl.) Miers .....	49
4.6.1.1 Termogravimetria (TG) .....	49
4.6.1.2 Análise térmica diferencial (DTA) .....	49
4.6.1.3 Calorimetria exploratória diferencial (DSC) .....	49
4.6.2 OBTENÇÃO DO PERFIL ESPECTROSCÓPICO NA REGIÃO DO INFRAVERMELHO .....	50
4.6.3 PROSPECÇÃO QUÍMICA DO EXTRATO BRUTO DE <i>Pyrostegia venusta</i> (Ker Gawl.) Miers .....	50
4.7 Avaliação da citotoxicidade do extrato bruto e frações de <i>Pyrostegia venusta</i> (Ker Gawl.) Miers em células mononucleares do sangue periférico (PBMC) .....	54
4.8 Cultura celular e preparação dos ensaios em macrófagos RAW 264.7 .....	55
4.9 Avaliação da citotoxicidade do extrato bruto e frações de <i>Pyrostegia venusta</i> (Ker Gawl.) Miers em macrófagos murinos RAW 264.7 .....	55
4.10 Avaliação da atividade imunomoduladora do extrato bruto e frações de <i>Pyrostegia venusta</i> (Ker Gawl.) Miers através da dosagem de NO .....	56
4.11 Avaliação da atividade antimicrobiana do extrato bruto, frações e marcadores acteosídeo e $\beta$ -OH-verbascosídeo de <i>Pyrostegia venusta</i> (Ker Gawl.) Miers .....	56
4.11.1 DILUIÇÃO DOS EXTRATOS E MARCADORES .....	56
4.11.2 PREPARO DOS MEIOS DE CULTURA .....	57
4.11.3 OBTENÇÃO E MANUTENÇÃO DAS CEPAS .....	57
4.11.4 PREPARO DOS INÓCULOS .....	58
4.11.5 TESTE DE MICRODILUIÇÃO EM CALDO .....	58
4.11.6 DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO INIBITÓRIA MÍNIMA (CIM) E BACTERICIDA MÍNIMA (CBM) E FUNGICIDA MÍNIMA (CFM) .....	58
4.11.7 TESTE DE ADERÊNCIA EM LAMÍNULA DE VIDRO .....	59
4.11.8 EFEITO DOS EXTRATOS NA PRODUÇÃO DE ÁCIDOS .....	60
4.11.9 EFEITO DOS EXTRATOS NO BROTAMENTO DE <i>Candida albicans</i> ...	60
5 RESULTADOS .....	61
5.1 Caracterização física e química do pó de <i>Pyrostegia venusta</i> (Ker Gawl.) Miers .....	62
5.1.1 DETERMINAÇÃO DA DISTRIBUIÇÃO GRANULOMÉTRICA .....	62
5.1.2 DETERMINAÇÃO DA PERDA POR DESSECAÇÃO .....	63

5.1.3 DETERMINAÇÃO DO TEOR DE CINZAS TOTAIS .....	63
5.1.4 TERMOGRAVIMETRIA (TG) E ANÁLISE TÉRMICA DIFERENCIAL (DTA) .....	64
5.1.5 CALORIMETRIA EXPLORATÓRIA DIFERENCIAL (DSC) .....	65
5.1.6 PERFIL ESPECTROSCÓPICO NA REGIÃO DO INFRAVERMELHO (IV) .....	66
5.2 Caracterização física e química da tintura de <i>Pyrostegia venusta</i> (Ker Gawl.) Miers .....	66
5.2.1 DETERMINAÇÃO DA DENSIDADE APARENTE .....	66
5.2.2 DETERMINAÇÃO DO pH .....	67
5.2.3 DETERMINAÇÃO DO TEOR DE SÓLIDOS .....	67
5.3 Obtenção do extrato bruto e frações de <i>Pyrostegia venusta</i> (Ker Gawl.) Miers .....	67
5.4 Perfil térmico do extrato bruto liofilizado de <i>Pyrostegia venusta</i> (Ker Gawl.) Miers .....	68
5.4.1 TERMOGRAVIMETRIA (TG) E ANÁLISE TÉRMICA DIFERENCIAL (DTA) .....	68
5.4.2 CALORIMETRIA EXPLORATÓRIA DIFERENCIAL (DSC) .....	69
5.4.3 PERFIL ESPECTROSCÓPICO NA REGIÃO DO INFRAVERMELHO (IV) .....	70
5.5 Prospecção química do extrato bruto de <i>Pyrostegia venusta</i> (Ker Gawl) Miers .....	70
5.6 Avaliação da citotoxicidade do extrato bruto e frações de <i>Pyrostegia venusta</i> (Ker Gawl) Miers em PBMC .....	71
5.7 Avaliação da citotoxicidade do extrato bruto e frações de <i>Pyrostegia venusta</i> (Ker Gawl) Miers em macrófagos murinos RAW 264.7 pelo ensaio de MTT .....	72
5.8 Avaliação da atividade imunomoduladora do extrato bruto e frações de <i>Pyrostegia venusta</i> (Ker Gawl.) Miers através da dosagem de NO .....	73
5.9 Avaliação da atividade antimicrobiana do extrato bruto, frações e marcadores acteosídeo e $\beta$ -OH-verbascosídeo de <i>Pyrostegia venusta</i> (Ker Gawl) Miers .....	74
5.9.1 TESTE DE MICRODILUIÇÃO EM CALDO, CIM, CBM E CFM .....	74
5.9.2 TESTE DE ADERÊNCIA EM LAMÍNULA DE VIDRO .....	82
5.9.4 TESTE DO BROTAMENTO .....	83
6 DISCUSSÃO .....	85
7 CONCLUSÕES .....	94
8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	96

# 1 INTRODUÇÃO

## 1 INTRODUÇÃO

As plantas medicinais representam a forma de medicação mais antiga e difundida no mundo. Evidências arqueológicas indicam que o uso de plantas medicinais era regularmente empregado por pessoas na pré-história e, desde então, a sua exploração vem crescendo gradualmente através da distribuição independente e da difusão cultural pelo mundo todo (HALBERSTEIN, 2005).

O Brasil é o país com a maior biodiversidade de plantas do mundo, possuindo um número estimado de 25% do número total de espécies do planeta. O país possui a mais diversa flora, número superior a 55 mil espécies descritas, o que corresponde a 22% do total mundial. Esta rica biodiversidade é acompanhada por uma ampla aceitação de uso de plantas medicinais aliada ao conhecimento da medicina tradicional (CARVALHO *et al.*, 2007).

Além do emprego na medicina tradicional, as plantas medicinais têm sido alvo das pesquisas científicas no Brasil e no mundo nos últimos anos, pois são fontes importantes de substâncias naturais biologicamente ativas, muitas das quais constituem modelos para a síntese de um grande número de fármacos, revelando nesses produtos alta diversidade em termos de estrutura e de propriedades físico-químicas e biológicas (GOTHANDAM *et al.*, 2010; TUROLLA e NASCIMENTO, 2006).

A espécie *Pyrostegia venusta* (Ker Gawl) Miers é uma liana trepadeira popularmente conhecida como flor-de-São-João ou cipó-de-São-João, encontrada no sul do Brasil e em outros países da América do Sul (SANDWICH e HUNT, 1974; ROSSATTO e KOLB, 2010). É utilizada na medicina popular para o tratamento de diversas enfermidades. Na literatura científica, vários compostos bioativos já foram isolados e algumas atividades biológicas importantes, como a atividade antimicrobiana e imunomoduladora, também já foram atribuídas a esta espécie (ROY *et al.*, 2012).

O uso de plantas medicinais para o tratamento de doenças é uma prática abrangente e pode ser adotada para fins diversos como, por exemplo, no tratamento de doenças bucais (MONTEIRO *et al.*, 2002; CORDEIRO *et al.*, 2006). A cárie e a doença periodontal são as doenças bucais mais prevalentes na população brasileira,

sendo o biofilme dental o fator etiológico primário no estabelecimento dessas patologias (PEDRAZZI *et al.*, 2009). Outra doença bucal bastante comum é a candidíase oral que ocorre devido à infecção por espécies do gênero *Candida* (ISHIDA *et al.*, 2006).

A Pesquisa Nacional de Saúde Bucal realizada recentemente pelo Ministério da Saúde (SB Brasil 2010) indica que, segundo a classificação adotada pela Organização Mundial de Saúde (OMS), as regiões Norte e Nordeste possuem as piores médias do índice de dentes cariados, perdidos e obturados (CPO) aos 12 anos em relação às demais regiões do país. No que diz respeito às condições periodontais, as regiões Norte e Nordeste também foram piores em todas as idades e grupos etários, quando comparadas com as demais regiões do país (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2011).

O controle mecânico do biofilme dental é a principal forma de prevenir as doenças bucais e é realizado, principalmente, através da escovação. Entretanto, sabe-se que o controle químico também pode ser utilizado como um método complementar eficaz, visto que pode atuar não só na desorganização do biofilme como na adesão e no metabolismo das bactérias (DITTERICH *et al.*, 2007).

Atualmente, as novas estratégias de prevenção e tratamento das doenças bucais não se limitam apenas no combate aos patógenos específicos mas, também, buscam formas de interferir nos fatores ambientais que levam a seleção de tais bactérias patogênicas, visto que o ambiente bucal é bastante dinâmico devido às suas características anátomo-fisiológicas peculiares (MARSH, 2003).

Na Odontologia, assim como nas demais áreas da saúde, várias pesquisas são realizadas com intuito de solucionar as patologias e de melhorar as condições de vida do paciente. Dessa forma, estudos visam elucidar as propriedades físico-químicas e biológicas de materiais e substâncias para descobrir novas alternativas que ofereçam melhores condições e/ou menores custos aos pacientes (FRANCISCO, 2010).

A fitoterapia é a utilização de medicamentos desenvolvidos exclusivamente a partir de matérias-primas de origem vegetal, plantas ou suas partes, com finalidade profilática, curativa, paliativa ou de diagnóstico (LIMA JÚNIOR *et al.*, 2005).

Atualmente, é notável o interesse da pesquisa científica pela fitoterapia aplicada à odontologia, visto que há um crescente número de publicações em periódicos nacionais e internacionais sobre o assunto. Isto se deve ao potencial

biológico que os extratos vegetais e seus compostos bioativos possuem e, portanto, podem atuar na prevenção e tratamento de doenças como a cárie, a doença periodontal e a candidíase oral (JOVITO, 2009).

O interesse da pesquisa na busca por novos agentes terapêuticos na Odontologia também visa novos produtos e/ou insumos com menos reações adversas, maior espectro de ação contra microrganismos resistentes e infecções oportunistas que afetam pacientes imunodeficientes (MAREGESI *et al.*, 2008; TOLEDO *et al.*, 2011).

Nesse sentido, este trabalho procurou avaliar atividades biológicas importantes da espécie vegetal *Pyrostegia venusta* e sua potencial utilização na prevenção e tratamento das principais doenças bucais.

## **2 REVISÃO DE LITERATURA**

## 2 REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1 Família Bignoniaceae

A família Bignoniaceae inclui aproximadamente 113 gêneros e 800 espécies de árvores, arbustos ou lianas, distribuídos em regiões tropicais e subtropicais, particularmente na América do Sul (DUARTE e JURGENSEN, 2007). No Brasil, 45 gêneros e 269 espécies desta família já foram registrados (GENTRY, 1980; SOUZA *et al.*, 2010a).

A família Bignoniaceae compreende um grande número de espécies com hábito lianescente, que podem ser definidas como plantas vasculares enraizadas no solo cujo crescimento em altura depende da sustentação mecânica fornecida por outras plantas (PUTZ e WINDSOR, 1987; SOUZA *et al.*, 2010a).

As flores das espécies lianescentes da família Bignoniaceae são vistosas, bissexuadas, zigomorfas, diclamídeas, pentâmeras, com quatro estames didínamos e um estaminódio; o ovário é súpero, bicarpelar, bilocular, raramente unilocular, com placentação axial ou raramente parietal, placenta bipartida e geralmente pluriovulado (SOUZA e LORENZI, 2005).

As plantas da família Bignoniaceae são amplamente utilizadas na medicina popular em inúmeros países (África, Brasil, Bolívia, Colômbia, México, Peru, Venezuela) para o tratamento de feridas, diabetes, reumatismo, doenças venéreas, malária, leishmaniose, como antimicrobiano, anti-inflamatório, anticonvulsivante, diurético, entre outras (RAHMATULLAH *et al.*, 2010).

Elas apresentam uma diversidade de classes de metabólitos secundários, entre os quais pode-se citar as lignanas, flavonoides, monoterpenos, triterpenos, ácidos cinâmicos e benzoicos, naftoquinonas e, raramente, alcaloides (OLIVEIRA *et al.*, 1990).

Diversos compostos bioativos de importância farmacológica já foram relatados nas Bignoniaceae e incluem o ácido ursólico, ácido oleanólico,  $\alpha$ - e  $\beta$ -lapachona, lapachol, verbascosídeo, lupeol, quercetina, apigenina, ácido pomólico e isoacteosídeo. Porém, foi a comprovação de diversas atividades biológicas e

farmacológicas do lapachol e de vários de seus produtos que, sem dúvida, despertou um maior interesse pela química das Bignoniaceae a partir da década de 70 (GOTTLIEB e MORS, 1980; OLIVEIRA *et al.*, 1990; RAHMATULLAH *et al.*, 2010).

Na literatura, tais compostos bioativos demonstraram atividades biológicas importantes como a atividade tripanocida, antioxidante, antidiabética, antiplasmódica, anti-inflamatória, antimicrobiana, imunoestimulante, antinociceptiva, antitumoral, entre outras (RAHMATULLAH *et al.*, 2010).

### 2.1.1 *Pyrostegia venusta* (Ker Gawl.) Miers

A espécie *Pyrostegia venusta* (Ker Gawl) Miers, pertencente à família Bignoniaceae, é uma liana trepadeira popularmente conhecida como flor-de-São-João ou cipó-de-São-João. Sua distribuição geográfica compreende o sul do Brasil até o Paraguai, Bolívia e nordeste da Argentina. No Brasil, é comumente encontrada nas florestas Atlânticas e savanas do Cerrado (SANDWITH e HUNT, 1974; ROSSATTO e KOLB, 2010).

Esta espécie apresenta inflorescências usualmente de cor laranja intensa, que surgem entre julho e setembro e são recursos importantes para beija-flores e psitacídeos, que se alimentam do néctar (GOBATO-RODRIGUES e STORT, 1992; DUARTE e JURGENSEN, 2007).

As flores de *Pyrostegia venusta* são ofertadas em inflorescências terminais, plurifloras, compostas e mista, são pedunculadas, sem brácteas, com as peças florais com disposição cíclica, diclamídea, heteroclamídea. São hermafroditas, isostêmones e hipóginas, protândricas, com antese ocorrente ao longo de todo o dia. O cálice é verde, com sépalas unidas (gamosépala), a corola é vermelho-alaranjada, com pétalas em forma de unha e caduco ao final da vida da flor. Os estames possuem filete simples (sem ramificação), livres, inclusos. O gineceu é completo, com ovário, estilete e estigma, gamocarpelar, pluricarpelar. O estilete é cilíndrico e terminal, enquanto o estigma é foliáceo, indiviso; e o ovário súpero, bilocular, bicarpelar (FAEGRI e VAN DER PJIL 1980).

Na medicina popular, o extrato obtido por decocção a partir das folhas e flores desta espécie é utilizado para o tratamento de tosse, bronquite, resfriado, diarreia e

vitiligo (FERREIRA *et al.*, 2000; SCALON *et al.*, 2008; VELOSO *et al.*, 2010). Já o extrato obtido por infusão das cascas e raízes é utilizado no tratamento de erisipela, icterícia (hiperbilirrubinemia e deposição de pigmentos biliares) e no tratamento de infecções uterinas e no trato genital feminino de recém-nascidas (SENS, 2002; MAGALHÃES *et al.*, 2010a).

Através de estudos fitoquímicos foram revelados os principais constituintes das flores de *Pyrostegia venusta* dos quais pode-se citar o  $\beta$ -sitosterol, n-hentriacontano, 7-O- $\beta$ -D-glicopiranosilacetina, meso-inositol, aminoácidos e açúcares (DUBEY e MISRA, 1976; VELOSO *et al.*, 2010). Sendo que já foi demonstrada a atividade anti-inflamatória de dois desses constituintes químicos,  $\beta$ -sitosterol e 7-O- $\beta$ -D-glicopiranosilacetina, além da atividade antitumoral de  $\beta$ -sitosterol (GUPTA *et al.*, 1980; JU *et al.*, 2004; SILVA *et al.*, 2012; VELOSO *et al.*, 2012).

Recentemente, algumas atividades biológicas importantes de *Pyrostegia venusta* foram relatadas na literatura. A atividade melanogênica dos extratos das folhas e flores em células de melanoma foi confirmada por Moreira e colaboradores (2012), dando suporte ao uso popular no tratamento das doenças que causam hipopigmentação, como o vitiligo. Outra importante descoberta foi a capacidade antitumoral do extrato hidroalcoólico das flores de *Pyrostegia venusta*, demonstrada por Silva e colaboradores (2012), em um modelo experimental de tumor induzido por *Agrobacterium tumefaciens* em disco de batata.

Nisha e colaboradores (2012) observaram a atividade anti-helmíntica dos extratos clorofórmio e metanólico do caule e folhas de *Pyrostegia venusta* frente a *Pheretima posthuma*. Já Veloso e colaboradores (2012) demonstraram que o extrato das flores possui efeito antinociceptivo através de ensaios de contorção abdominal induzida por ácido acético e formalina em ratos, e anti-inflamatório pelo teste de edema de pata induzido por carragenina e peritonite induzida por lipopolissacarídeo (LPS).

Outra atividade biológica de *Pyrostegia venusta* foi demonstrada por Silva e colaboradores (2011), cujos extratos acetato de etila e metanólico das folhas apresentaram atividade antioxidante através dos ensaios de 2,2-difenil-1-picril-hidrazila (DPPH) e Folin-Ciocalteu. Roy e colaboradores (2011) confirmaram a atividade antioxidante *in vitro* do extrato metanólico das flores e raízes através dos ensaios de DPPH, Potencial Redutor do Íon Férrico (FRAP) e do radical 2,2'-

azinobis-3-etilbenzotiazolina-6-ácido sulfônico (ABTS). Em outro estudo, Roy e colaboradores (2012) também demonstraram a capacidade antioxidante *in vivo* do extrato metanólico das flores de *Pyrostegia venusta*.

Além disso, foi demonstrada a atividade antimicrobiana do extrato hexânico (9 mg/mL e 5 mg/mL) das folhas de *Pyrostegia venusta* contra cepas de *Staphylococcus aureus* e *Enterococcus hirae*, respectivamente; e do extrato acetato de etila (3 mg/mL) contra *Candida albicans* (SILVA *et al.*, 2011). Segundo Roy e colaboradores (2012), o extrato metanólico das flores (100 a 400 µg/disco) também demonstrou atividade antimicrobiana contra *Bacillus subtilis*, *Staphylococcus epidermidis*, *Staphylococcus pyogenes*, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Micrococcus luteus*, *Enterobacter aerogenes*, *Salmonella typhi*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Candida albicans*, *Aspergillus niger* e *Candida tropicalis*.

Ainda no estudo de Roy e colaboradores (2012), o extrato metanólico das flores de *Pyrostegia venusta* demonstrou capacidade imunomoduladora de citocinas pró-inflamatórias e anti-inflamatórias, o que pode estar relacionado com a cicatrização de feridas em pele de ratos observada nesse estudo.

### 2.1.2 VERBASCOSÍDEO/ACTEOSÍDEO

Os propanoídeos pertencem à classe dos polifenóis hidrossolúveis amplamente distribuídos no reino vegetal. O verbascosídeo, também conhecido como acteosídeo (Figura 1) é um glicosídeo feniletanoide já isolado e descrito em diversas espécies vegetais (LAU *et al.*, 2004; CARVALHO, 2006; PAPOUTSI *et al.*, 2006), dentre as quais estão *Castilleja linariaefolia* (PETTIT *et al.*, 1990), *Lantana camara* (HERBERT *et al.*, 1991), *Pedicularis lasiophrys* (JIA *et al.*, 1992), *Stachys officinalis* (MIYASE *et al.*, 1996), *Stachytarpheta cayennensis* (SCHAPOVAL *et al.*, 1998), *Scutellaria baicalensis* (XIE *et al.*, 2002), *Buddlejae Flos* (LEE *et al.*, 2005); *Halleria lucida* (FRUM *et al.*, 2007), *Cistanche deserticola* (LI *et al.*, 2008), *Penstemon barbatus* (XIE *et al.*, 2012).

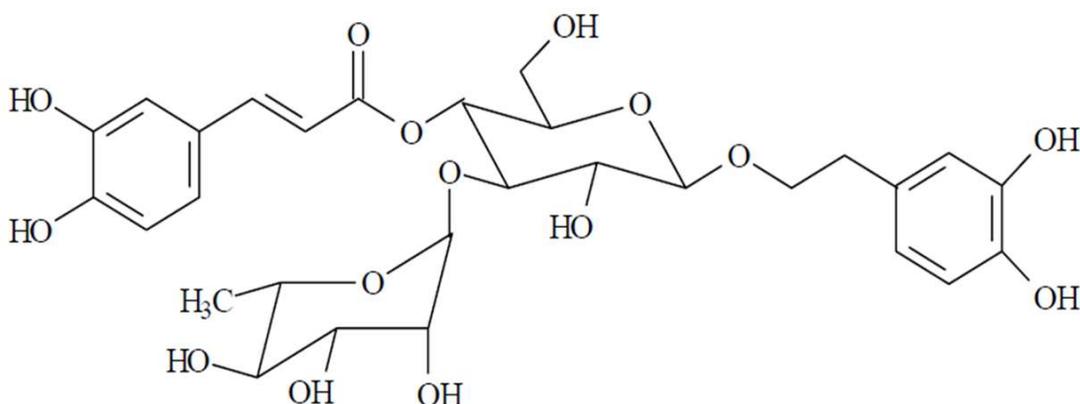


Figura 1: Estrutura química do verbascosídeo (Fonte: FRUM *et al.*, 2007)

Diversas atividades biológicas já foram atribuídas a este composto químico. Atividade neuroprotetora (KOO *et al.*, 2005), estrogênica/antiestrogênica (PAPOUTSI *et al.*, 2006), antioxidante (FRUM *et al.*, 2007), hepatoprotetora (ZHAO *et al.*, 2009), antimetastática (OHNO *et al.*, 2002), antiproliferativa (ABE *et al.*, 2002), antimicrobiana (LIMA *et al.*, 2003) e imunomoduladora (LAU *et al.*, 2004).

Mais especificamente, quanto à atividade antimicrobiana, Lima e colaboradores (2003) isolaram verbascosídeo e isoverbascosídeo, misturaram ambos os compostos e testaram a atividade antimicrobiana pelo teste de difusão em disco. O resultado foi positivo para *Staphylococcus aureus*, *Micrococcus luteus*, *Bacillus subtilis*, *Bacillus mycoides*, *Enterococcus faecalis*, *Escherichia coli*, *Serratia marcescens* e *Candida albicans*, cuja concentração inibitória mínima (CIM) variou de 600 a 300 µg/mL.

Em outro estudo, Pereira e colaboradores (2008) confirmaram a atividade antimicrobiana deste composto, através do método de microdiluição em caldo, contra *Aeromonas hydrophila*, *Bacillus subtilis*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Staphylococcus aureus* e obtiveram CIM de 120, 1000, 1000 e 250 µg/mL, respectivamente.

Ainda sobre a atividade antimicrobiana, Vandresen e colaboradores (2010) realizaram o ensaio de bioautografia para encontrar a CIM do verbascosídeo frente a *Staphylococcus aureus* e *Micrococcus luteus*. O resultado foi 500-250 µg/mL e 1000-500 µg/mL, respectivamente. Por fim, Souza e colaboradores (2010b) também demonstraram a atividade antimicrobiana deste composto contra *Streptococcus pyogenes*, *Staphylococcus epidermidis* e *Staphylococcus aureus* pelo teste de

difusão em ágar. A CIM encontrada foi de 62 µg/mL, 32 µg/mL e 63 µg/mL, respectivamente.

Em relação à atividade imunomoduladora, Lau e colaboradores (2004) descreveram que, na concentração de 30 µM, o acteosídeo reduziu o relaxamento endotelial dependente de óxido nítrico (NO), induzido pela acetilcolina, em anéis de aorta de ratos *in vitro*, através da inibição da produção de NO dependente de cálcio. Lee e colaboradores (2005) também notaram que o acteosídeo foi capaz de inibir a produção de NO em macrófagos estimulados com LPS na concentração de 100 µM.

## 2.2 Biofilme dental e as doenças bucais

De uma forma geral, o biofilme pode ser definido como uma comunidade cooperativa, bem organizada, de células microbianas aderidas a uma superfície úmida e aglomerada por matriz extracelular (NASCIMENTO *et al.*, 2006). A placa dental é um biofilme encontrado nos tecidos moles e duros da cavidade oral constituído por um grupo heterogêneo de microrganismos embebidos em uma matriz de polissacarídeos e saliva (MARINHO e ARAÚJO, 2007).

Embora a composição microbiana varie em diferentes locais na cavidade oral, principalmente quando se compara placa supragengival e placa subgengival, existem as fases de desenvolvimento do biofilme dental, academicamente divididas em: fase de fixação, fase de multiplicação e fase de maturação do biofilme (MARSH, 2010b).

Na primeira fase de desenvolvimento do biofilme dental, ocorrem mecanismos de adesão à película de glicoproteína (película adquirida) que se forma sobre o esmalte e outras superfícies dentárias expostas. Os microrganismos com maior capacidade de se aderir aos dentes nesta fase inicial são definidos como colonizadores primários (MARINHO e ARAÚJO, 2007; MARSH, 2010b).

A segunda fase de desenvolvimento do biofilme dental envolve mecanismos de interação bacteriana e a produção de uma matriz extracelular. Muitos microrganismos não se aderem inicialmente aos dentes, mas são capazes de se aderir (co-adesão) a microrganismos primários que se estabelecem na fase inicial.

Estes são denominados de colonizadores secundários (MARINHO e ARAÚJO, 2007; MARSH, 2010b).

Na terceira fase, o biofilme dental atinge um estágio de equilíbrio dinâmico, onde os diversos microrganismos que compõem o biofilme estão em constante adaptação às alterações ambientais. A microbiota da terceira fase apresenta microrganismos colonizadores primários e secundários, e também os microrganismos colonizadores tardios, isto é, aqueles que aumentam como consequência do acúmulo microbiano no biofilme dentário. (MARINHO e ARAÚJO, 2007; MARSH, 2010b).

A placa dental é possivelmente o biofilme mais estudado, sendo importante no desenvolvimento das principais patologias bucais: a cárie e a doença periodontal (COSTERTON *et al.*, 1999).

A cárie é uma doença crônica, infecciosa, transmissível e multifatorial, iniciada pela desmineralização do esmalte dentário, devido aos ácidos produzidos pela fermentação de carboidratos por bactérias, causando uma diminuição no pH do ambiente bucal (FONTANA *et al.*, 2010).

O *Streptococcus mutans* é o principal agente microbiano da cárie dental em humanos por possuir a capacidade de colonizar os dentes, produzir polissacarídeos intra e extracelulares, ser altamente acidogênico e acidúrico, e metabolizar várias glicoproteínas salivares, sendo responsável principalmente pela fase inicial da lesão cariosa. Já os lactobacilos, por não possuírem capacidade de aderência à superfície dentária, estão mais associados à progressão da lesão (MALTZ e CARVALHO, 1997; ALVES *et al.*, 2010).

A aderência tem um papel bem estabelecido na virulência do *S. mutans*, uma vez que ele é capaz de sintetizar glucanos extracelulares a partir da sacarose pelo uso de glucosiltransferases. Os glucanos são altamente aderentes a várias superfícies sólidas, conferindo ao *S. mutans* a capacidade de se aderir à superfície dentária de forma firme e irreversível, podendo levar à formação do biofilme e o desenvolvimento da cárie (SASAKI, 2006; LIMA, 2009).

O *Streptococcus oralis* e o *Streptococcus mitis* também são comumente encontrados no biofilme, porém, por não serem acidogênicos, nem acidúricos, estão presentes em seu estágio inicial de formação, não atuando diretamente na desmineralização do esmalte dentário, apenas tornando o meio mais adequado para colonização dos *S. mutans* (PALOMER, 2006; ALVES *et al.*, 2010).

O biofilme dental é formado por um grupo heterogêneo de microrganismos capazes de metabolizar carboidratos, resultando na produção de ácidos orgânicos como o ácido láctico, fórmico, acético, succínico, etc (LIU e LI, 2010). Essa concentração de ácidos pode levar a uma queda do pH bucal, ocasionando a dissolução dos cristais de hidroxiapatita e, assim, à formação de uma lesão de cárie incipiente (THYLSTRUP e FEJERSKOV, 1995; KERESKI, 2012).

A doença periodontal é uma doença infecciosa e inflamatória que acomete os tecidos ao redor dos dentes e inclui a gengivite e a periodontite. A gengivite é o processo inflamatório da gengiva sem a perda dos tecidos de suporte dos dentes, já a periodontite envolve a destruição das estruturas de suporte, incluindo o ligamento periodontal, o osso alveolar e o cemento radicular e pode levar à perda do elemento dental (KINANE, 2001; ARMITAGE, 2004).

Até a década de 70, as estratégias para o tratamento da doença periodontal eram baseadas na compreensão de que a placa e seus produtos bacterianos eram responsáveis pela destruição tecidual. Este conceito mudou quando pesquisadores começaram a relacionar fatores do hospedeiro com a patogênese da doença (PAQUETTE e WILLIAMS, 2000; TAYLOR *et al.*, 2004).

Microrganismos patogênicos, como *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, *Porphyromonas gingivalis* e *Tannerella forsythia*, ainda são os agentes causadores primários. Entretanto, sabe-se que citocinas e mediadores inflamatórios podem causar destruição tecidual local refletida, clinicamente, em bolsas periodontais e perda óssea alveolar. Além disso, as condições ambientais resultantes desses eventos inflamatórios e imunológicos continuam dando suporte à microbiota patogênica e perpetuam esse ciclo de eventos (PAQUETTE e WILLIAMS, 2000; SOCRANSKY, HAFFAJEE, 2002).

Os processos inflamatórios e imunológicos se instalam nos tecidos orais para protegê-los contra a presença, invasão e disseminação de microrganismos e seus produtos. Em alguns casos, essas reações de defesa do hospedeiro podem ser prejudiciais por serem, também, passíveis de danificar as células e estruturas vizinhas do tecido conjuntivo. Dessa forma, tais processos “defensivos” podem, paradoxalmente, responder pela maior parte da lesão tecidual observada na gengivite e na periodontite (MADIANOS *et al.*, 2005; LIMA *et al.*, 2008).

A *Candida albicans* é a levedura mais frequentemente isolada da cavidade bucal, entretanto, a presença dela não é necessariamente indicativa de doença, pois

pode ser isolada em cerca de 40% de indivíduos saudáveis em diversas faixas etárias (CAMPISI *et al.*, 2002; MENEZES *et al.*, 2009). Em algumas situações, espécies do gênero *Candida* podem comportar-se como patógenos oportunistas, originando infecções como a candidíase oral, por exemplo, em situações de baixa imunidade, desordens endócrinas, lesões em tecidos moles, higiene bucal deficiente, prolongada terapia antibiótica, fatores nutricionais, baixo fluxo salivar e uso de próteses (BARBIERI, 2005; ISHIDA *et al.*, 2006).

Muitos fatores de virulência podem contribuir para a invasividade e patogenicidade das leveduras como, por exemplo, a conversão de leveduras unicelulares em formas filamentosas, habilidade de aderir aos tecidos, hidrofobicidade da superfície celular e expressão de enzimas extracelulares (CALDERONE e FONZI, 2001; ISHIDA *et al.*, 2006).

A biologia de *Candida albicans* apresenta diferentes aspectos, entre eles, a habilidade de se apresentar com distintas morfologias. A fase unicelular leveduriforme pode gerar um broto e formar hifas verdadeiras. A formação de hifas ou filamentos capacita a célula para exercer força mecânica, ajudando na sua penetração nas superfícies epiteliais, e uma vez na corrente sanguínea, tem uma ação danosa sobre o endotélio, o que permite que a *Candida albicans* invada os tecidos profundos do organismo (KUMAMOTO, 2005).

### 2.2.1 A HIPÓTESE DA PLACA ECOLÓGICA

Existem duas hipóteses para explicar o papel da placa dental microbiana na doença: a hipótese da placa específica e a hipótese da placa não específica. A primeira propõe que apesar da diversidade de espécies microbianas presentes na placa, apenas um pequeno grupo de microrganismos está diretamente envolvido com a doença. Esta proposta dá suporte ao foco nas pesquisas de controle de alvos microbianos específicos (BOWDEN *et al.*, 1976; LOESCHE, 1976; MARSH *et al.*, 1989; MARSH, 2003). Já a hipótese da placa não específica propõe que a doença é o resultado de uma interação entre as diversas espécies microbianas presentes na placa e reconhece o conceito de placa como uma comunidade microbiana (THEILADE, 1986; MARSH, 2003).

Recentemente, uma nova hipótese tem sido sugerida pelos pesquisadores para explicar o papel da placa microbiana na doença: a hipótese da placa ecológica. Esta hipótese propõe que a seleção de bactérias patogênicas está diretamente ligada às mudanças ambientais e que as doenças bucais não precisam ter uma etiologia específica, pois qualquer espécie com características relevantes pode contribuir para o processo da doença (MARSH, 2003, 2006).

Segundo a hipótese da placa ecológica, alguns fatores ambientais são capazes de quebrar a homeostase da microflora bucal. No contexto da cárie, bactérias potencialmente cariogênicas são encontradas naturalmente na placa dental, porém em um pH neutro esses microrganismos são pouco competitivos e estão em pequena quantidade, além disso o processo de des-remineralização está em equilíbrio. Se a frequência no consumo de carboidratos fermentáveis aumentar então a placa ficará algum tempo abaixo do pH crítico para a desmineralização do esmalte (pH 5.5). Condições de baixo pH favorecem a proliferação de espécies acidúricas e acidogênicas, especialmente o *S. mutans* e os lactobacilos. Assim, o aumento na quantidade dessas espécies leva à uma produção de ácidos ainda maior, prolongando o processo de desmineralização (MARSH, 2003, 2006, 2010a).

No contexto da doença periodontal, a placa subgengival de sítios saudáveis pode ser colonizada por patógenos periodontais naturalmente encontrados na boca, mas em níveis extremamente baixos. Tais espécies não conseguem competir com as espécies Gram-positivas sacarolíticas que predominam no estado de saúde periodontal. Todavia, se houver um acúmulo da placa, os níveis de patógenos periodontais não são mais compatíveis com saúde. Dessa forma, a resposta inflamatória resultante leva a um aumento do fluido crevicular gengival que, por sua vez, muda o status nutricional local, favorecendo as espécies anaeróbias Gram-negativas proteolíticas. As proteases produzidas desregulam o controle da resposta inflamatória do hospedeiro, aumentando ainda mais a biomassa de Gram-negativas (MARSH e BOWDEN, 2000; MARSH, 2010a).

De acordo com a hipótese da placa ecológica, as doenças bucais poderiam ser prevenidas não apenas focando diretamente nos patógenos putativos como, por exemplo, através de estratégias com agentes antimicrobianos e antiadesivos, mas também interferindo nos fatores que levam a seleção de bactérias patogênicas (MARSH, 2003, 2006).

Dessa forma, de uma perspectiva ecológica, as estratégias de prevenção da cárie seriam: (1) inibição da produção de ácidos na placa e (2) fatores relacionados à dieta e o estímulo à produção de saliva; e as estratégias de prevenção das doenças periodontais seriam: (1) redução do fluxo do fluido crevicular gengival através de agentes anti-inflamatórios e (2) tornar o meio menos anaeróbio através do uso de agentes oxigenantes e redutores (OWER *et al.*, 1995; MARSH, 2003).

## **2.3 Atividades Biológicas**

### **2.3.1 ATIVIDADE ANTIMICROBIANA**

A principal forma de prevenir as infecções bucais é através do controle mecânico do biofilme dental. Entretanto, existem diversas limitações em relação à remoção feita pelo próprio paciente. Nesse sentido, o controle químico da placa, geralmente, é adotado como um método complementar eficaz (TORRES *et al.*, 2000).

A clorexidina tem sido utilizada em odontologia há muitos anos como padrão-ouro no controle químico da placa bacteriana por ser um agente antimicrobiano de largo espectro, seguro e eficaz. Em altas concentrações é bactericida e em baixas concentrações é bacteriostático. Embora a clorexidina seja um excelente agente, o seu uso prolongado não é recomendado devido aos efeitos adversos já relatados como manchamento dos dentes, descamação reversível da mucosa, alterações do paladar, aumento dos depósitos calcificados supragengivais e, raramente, tumefação uni ou bilateral da parótida (TORRES *et al.*, 2000; ZANATTA e RÖSING, 2007).

As plantas medicinais possuem inúmeros compostos biologicamente ativos que representam uma rica fonte de agentes antimicrobianos (GOTHANDAM *et al.*, 2010; MALAR *et al.*, 2011). O interesse da pesquisa científica na descoberta desses novos agentes surgiu a partir da necessidade de desenvolver novos produtos e/ou insumos com menor custo, menos reações adversas, maior espectro de ação contra

microrganismos resistentes e infecções oportunistas que afetam pacientes imunodeficientes (MAREGESI *et al.*, 2008; TOLEDO *et al.*, 2011).

Existem diversos estudos sobre o potencial antimicrobiano e antiaderente de extratos obtidos de espécies vegetais em microrganismos presentes no biofilme dental. Pereira e colaboradores (2006a) demonstraram o potencial antimicrobiano e antiaderente do extrato da casca de *Punica granatum* (romã) em *S. mitis*, *S. mutans*, *Streptococcus sanguis*, *Streptococcus sobrinus* e *Lactobacillus casei*, sugerindo seu emprego como meio alternativo no controle da formação do biofilme dental.

No estudo de Albuquerque e colaboradores (2010b), foi observado o efeito antiaderente do óleo essencial extraído de *Matricaria recutita* (camomila) sobre *S. mutans*, *S. sanguis* e *L. casei*. Da mesma forma, Macedo-Costa e colaboradores e Albuquerque e colaboradores (2010a) demonstraram que o extrato da flor da camomila apresenta atividade antimicrobiana sobre *S. mitis*, *S. mutans*, *S. sanguis*, *S. sobrinus* e *L. casei*.

O extrato das folhas da espécie *Lippia sidoides* (alecrim-pimenta) demonstrou atividade antimicrobiana em cepas de *S. mitis*, *S. mutans*, *S. sanguis*, *S. sobrinus* e *L. casei*, no estudo de Albuquerque e colaboradores (2010a), sugerindo sua possível utilização como agente antimicrobiano alternativo.

Segundo Pereira e colaboradores (2006b), o extrato do caule de *Anacardium occidentale* (cajueiro) é capaz de inibir a síntese de glucano de três linhagens bacterianas cariogênicas e formadoras de placa supragengival (*S. mitis*, *S. mutans* e *S. sanguis*).

Além do potencial antimicrobiano e antiaderente, outras pesquisas demonstram a atividade antifúngica de extratos vegetais em leveduras que podem causar infecções bucais. Alves e colaboradores (2009) avaliaram a atividade antifúngica das seguintes espécies: *Myracrodruon urundeuva* (aroeira-do-sertão), *Malva sylvestris* (malva) e *Psidium guajava* (goiabeira). Os autores observaram que estes extratos mostraram-se eficazes, inibindo o crescimento de fungos da cavidade oral.

De acordo com o estudo de Menezes e colaboradores (2009) sobre o potencial antifúngico de óleos essenciais e extratos de plantas da região amazônica, os extratos de *Eleutherine plicata* (marupazinho), *Psidium guajava* (goiabeira) e *Syzygium aromaticum* (cravo-da-índia) apresentaram atividade antifúngica em cepas de *C. albicans*.

Rodrigues e colaboradores (2009) avaliaram a atividade antifúngica do *Allium sativum* (alho) sobre cepas de *C. albicans* isoladas da cavidade bucal e obtiveram resultado positivo. Além disso, Dahake e colaboradores (2009) também demonstraram que o extrato das folhas de cajueiro possui atividade antifúngica em cepas de *C. albicans*. Assim como no estudo de Costa e colaboradores (2009) que apresentou o potencial antifúngico de *Rosmarinus officinalis* (alecrim) e *Syzygium cumini* (jambolão) sobre cepas clínicas de *C. albicans*.

Outra importante atividade biológica das plantas medicinais foi demonstrada por Sasaki e colaboradores (2007), cujo extrato bruto, aquoso e frações semi-purificadas de *Paullinia cupana* (guaraná) foram capazes de inibir a produção de ácidos por *S. mutans* na presença de glicose. Assim como Magalhães (2010b) que demonstrou a capacidade do extrato etanólico de *Piper aduncum* (pimenta-de-macaco) de reduzir a acidogênese de *S. mutans*.

### 2.3.2 ATIVIDADE IMUNOMODULADORA

O principal objetivo da terapia periodontal é controlar a lesão inflamatória de tal forma que a destruição progressiva do periodonto possa ser interrompida ou, pelo menos, que os picos de atividade da doença apresentem intervalos de tempo maiores. O bloqueio da resposta do hospedeiro juntamente com o controle das bactérias periodontopatogênicas representa um conceito emergente no tratamento da periodontite (OWER *et al.*, 1995; LIMA *et al.*, 2008).

Diversos estudos apontam as citocinas como importantes mediadores associados à patogênese da periodontite. Produtos bacterianos induzem a síntese de citocinas pró-inflamatórias como interleucina-1 (IL-1), interleucina-6 (IL-6), interleucina-8 (IL-8), fator de necrose tumoral alfa (TNF- $\alpha$ ) e mediadores como o óxido nítrico (NO) e a prostaglandina, principalmente por macrófagos (SHETTY *et al.*, 2013).

Dentre as várias citocinas, destacam-se o TNF- $\alpha$  e a IL-1, mediadores que podem potencialmente participar nesse processo. Tais citocinas estimulam a reabsorção óssea diretamente por induzir a proliferação de progenitores de osteoclastos, e indiretamente por estimular a atividade de reabsorção dos

osteoclastos maduros (ASSUMA *et al.*, 1998), e por aumentar a síntese de collagenases (MCGEE *et al.*, 1998).

Tem sido demonstrado que o bloqueio de TNF- $\alpha$  ou de IL-1 contribui para a inibição de aproximadamente 80% do recrutamento de células inflamatórias e redução de 60% da perda óssea que ocorre na periodontite (ASSUMA *et al.*, 1998).

Bactérias periodontopatogênicas e citocinas inflamatórias também podem induzir uma maior síntese de NO por macrófagos nos tecidos periodontais. A consequência local da alta produção de NO não apenas está envolvida com os mecanismos de defesa do hospedeiro, mas também contribui para o dano tecidual, causando destruição dos tecidos de sustentação do dente (LOHINAI *et al.*, 1998; LIMA *et al.*, 2008).

Além de participar dos processos imunoinflamatórios, TNF- $\alpha$  e NO podem ser utilizados como potenciais marcadores biológicos no diagnóstico e monitoramento da doença periodontal, uma vez que são encontrados em altos níveis na presença da doença (REHER *et al.*, 2007).

A atividade anti-inflamatória e imunomoduladora de plantas medicinais têm sido amplamente investigadas em diversos modelos experimentais com o intuito de buscar estratégias auxiliares ou alternativas nos processos inflamatórios como a periodontite (SHETTY *et al.*, 2013).

Harokopakis e colaboradores (2006) observaram a habilidade do extrato de *Sambucus nigra* (sabugueiro) em inibir a ativação do fator de transcrição NF $\kappa$ B p65 de células T auxiliares, sugerindo que esta planta poderia ser utilizada como adjuvante na terapia periodontal, já que com a não ativação de NF $\kappa$ B, citocinas pró-inflamatórias como TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  e IL-6 não seriam liberadas no sítio da inflamação, consequentemente osteoclastos não seriam ativados e o osso alveolar não seria reabsorvido.

Em outro estudo, Botelho e colaboradores (2007) demonstraram que os géis de *Lippia sidoides* (alecrim-pimenta) e *Myracrodruon urundeuva* (aroeira-do-sertão) foram capazes de inibir a produção de TNF- $\alpha$  e IL-1 $\beta$  em tecido gengival de ratos com doença periodontal experimental.

Antonietta e colaboradores (2012) testaram o resveratrol (um polifenol encontrado principalmente nas sementes de uva) em células do ligamento periodontal de humanos. Os resultados comprovaram que tal substância foi capaz de inibir a expressão de NO e a produção de citocinas pró-inflamatórias em células

do ligamento periodontal de humanos induzidos por LPS de *Porphyromonas gingivalis*.

Benso (2012) avaliou o efeito do extrato de *Malva sylvestris* (malva) sobre a liberação de TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  e NO induzido por LPS em fibroblastos *in vitro*, demonstrando sua capacidade de inibir tais citocinas e o mediador inflamatório, sugerindo que esta planta possui um potencial anti-inflamatório.

Shetty e colaboradores (2013) avaliaram o potencial imunomodulador do fitoterápico Septilin® (*Balsamodendron mukul*, *Shankha bhasma*, *Maharasnadi quath*, *Tinospora cordifolia*, *Rubia cordifolia*, *Emblica officinalis*, *Moringa pterygosperma*, *Glycyrrhiza glabra*) em pacientes com periodontite crônica. Foi observada uma redução nos índices de sangramento gengival e índice gengival, bem como nos níveis de TNF- $\alpha$  salivar.

## **3 OBJETIVOS**

### 3 OBJETIVOS

#### 3.1 Geral

Realizar um estudo físico, químico e biológico da espécie vegetal *Pyrostegia venusta* (Ker Gawl.) Miers e seu potencial na prevenção das doenças bucais.

#### 3.2 Específicos

- Caracterizar as propriedades físicas e químicas da matéria-prima vegetal (pó);
- Obter e caracterizar as propriedades físicas e químicas do produto intermediário (tintura);
- Avaliar a citotoxicidade do extrato bruto e frações de *Pyrostegia venusta* (Ker Gawl.) Miers;
- Avaliar a atividade imunomoduladora *in vitro* do extrato bruto e frações de *Pyrostegia venusta* (Ker Gawl.) Miers;
- Avaliar a atividade antimicrobiana *in vitro* do extrato bruto, frações e marcadores de *Pyrostegia venusta* (Ker Gawl.) Miers frente a microrganismos da cavidade bucal.

## **4 MATERIAL E MÉTODOS**

## 4 MATERIAL E MÉTODOS

### 4.1 Material

#### 4.1.1 MATÉRIA-PRIMA VEGETAL

- Nome científico: *Pyrostegia venusta* (Ker Gawl.) Miers
- Nome popular: flor-de-São-João, cipó-de-São-João
- Família: Bignoniaceae
- Parte usada: flores



Figura 2: *Pyrostegia venusta* (Ker Gawl.) Miers (Fonte: VERDI, 2010)

#### 4.1.2 REAGENTES E SOLUÇÕES

Etanol P.A. 99,4% - Labsynth, etanol 70% - Labsynth, hexano P.A. – Labsynth, acetato de etila P.A. – Labsynth, álcool n-butílico P.A. – Labsynth, metanol P.A. – Labsynth, ácido clorídrico P.A. – QUIMEX, ácido sulfúrico P.A. – QUIMEX, clorofórmio P.A. – QUIMEX, éter etílico P.A. – QUIMEX.

Solução de hidróxido de amônia, solução aquosa de niidrina a 1%, raspas de magnésio, solução aquosa de vanilina a 1%, reativos de Kedde, Bouchardat, Dragendorff, Mayer, Pascová, Fehling, solução de cloreto férrico 1%, hidróxido de sódio 1N e 2N, lugol, solução de cloreto de sódio 0,9%, formaldeído, o-dinitrobenzeno, solução de carbonato de sódio, solução de cloridrato de hidroxilamina, anidrido acético, solução p-dimetilaminobenzaldeído, tricloreto de antimônio, água oxigenada, tolueno, preparados no Laboratório de Fitoquímica (BARBOSA, 2001).

Ficoll-Hypaque – GE Healthcare/Amersham; MOPS – Sigma Aldrich; RPMI 1640 – Sigma Aldrich; gentamicina – Sigma Aldrich; soro fetal bovino – Sigma Aldrich; *Trypan blue* – Sigma Aldrich; caldo e ágar Sabouraud – Himedia, TSB – Himedia e Müller-Hinton – Himedia; extrato de levedura - Synth; vermelho de fenol – Sigma Aldrich; cloreto de sódio P.A.; sacarose P.A. – Merck; glicose P.A. – Merck; fosfato de potássio monobásico P.A. – Merck; fosfato de potássio dibásico P.A. – Merck; uréia P.A.– Merck; sulfato de magnésio P.A. – Merck.

#### 4.1.3 EQUIPAMENTOS

Balança analítica FA2104N (Bioprecisa); balança analítica modelo BK 500 (GEHAKA); estufa termoestabilizada Q-314M222 (Quimis); estufa modelo S805T (BIOPAR); moinho de facas; agitador eletromagnético para peneiras (Bertel); forno mufla modelo 355I (ENGRO); analisador de umidade por infravermelho IV 2000 (GEHAKA); analisador halógeno de umidade Ohaus modelo MB35 (Toledo); potenciômetro pH21 pH/mV meter (HANNA); analisador térmico modelo DTG-60 e DSC-60 (Shimadzu); espectrômetro de infravermelho IR100 spectrometer (Thermo

electro corporation); liquidificador de alta rotação modelo LS-04 (Siemens Ltda.); evaporador rotativo R-200 e banho maria R-490 (Büchi); liofilizador Alpha 1-4 (Christ); incubadora de CO<sub>2</sub> modelo COM-17AC (Sanyo); incubadora modelo 095E (Fanem); câmara de fluxo laminar modelo PA-115 (Pachane); vórtex (Scientific Industries); banho de ultra-som Ultrasonic Cleaner modelo 1450 Unique (MaxiClean); microscópio óptico (Olympus), centrífuga refrigerada 5804-R (Eppendorf).

## 4.2 Métodos

Esta pesquisa foi realizada nos laboratórios de Processamento de Material Vegetal, Pesquisa e Desenvolvimento (P&D) Farmacotécnico, Fitoquímica e Controle de Qualidade Microbiológico de Medicamentos e Correlatos da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal do Pará (UFPA), nos laboratórios de Farmacognosia e Microbiologia Aplicada a Produtos Naturais e Sintéticos da Universidade Estadual de Maringá (UEM) e no laboratório de Imunologia e Farmacologia da Universidade Federal do Rio de Janeiro – Campus Macaé (UFRJ).

### 4.2.1 OBTENÇÃO DO MATERIAL VEGETAL

A espécie *Pyrostegia venusta* (Ker Gawl.) Miers foi fornecida pelo laboratório de Farmacognosia da UEM, procedente de Naviraí - Mato Grosso do Sul, coletada no mês de junho de 2006.

#### 4.2.2 IDENTIFICAÇÃO DO MATERIAL VEGETAL

A espécie *Pyrostegia venusta* (Ker Gawl.) Miers foi identificada pela Dra. Maria Auxiliadora Milaneze Gutierre. Uma exsicata foi depositada no herbário do Departamento de Biologia da UEM sob número de registro HUEM11708.



Figura 3: Exsicata da espécie *Pyrostegia venusta* (Ker Gawl.) Miers (Fonte: <http://florida.plantatlas.usf.edu>)

#### 4.2.3 PROCESSAMENTO DO MATERIAL VEGETAL

As flores frescas foram submetidas à lavagem com água corrente e ligeiramente submergidas em álcool etílico 70%. Após a lavagem, o material vegetal foi submetido à secagem prévia por aproximadamente 72 horas, em temperatura ambiente, sobre bancadas previamente limpas e revestidas com papel absorvente.

Após a secagem prévia, o material vegetal foi transferido para uma estufa de ar circulante, a uma temperatura de  $40^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ , sendo que o período de secagem foi estabelecido com base no monitoramento de peso de uma amostra mantida nas dadas condições, por meio de repetidas pesagens. Concluída a nova secagem, o material foi novamente pesado após 48 horas.

A droga vegetal foi obtida por moagem em moinho de facas e armazenada em um recipiente de vidro previamente esterilizado e mantido ao abrigo da luz.

### **4.3 Caracterização física e química do pó de *Pyrostegia venusta* (Ker Gawl.) Miers (FARMACOPEIA BRASILEIRA 5ª ed., 2010)**

#### **4.3.1 DETERMINAÇÃO DA DISTRIBUIÇÃO GRANULOMÉTRICA**

Exatamente 10 g das flores secas pulverizadas foram submetidas à série de tamizes com abertura de malha 1,70 mm; 710, 355, 250, 180 e 125 µm, utilizando-se um agitador de peneiras, durante 20 minutos. O tamanho das partículas foi avaliado pela quantificação percentual de retenção do pó.

#### **4.3.2 DETERMINAÇÃO DA PERDA POR DESSECAÇÃO**

Exatamente 3 g do pó da planta foram transferidos para um pesa-filtro. A amostra foi submetida a aquecimento em estufa a 105°C durante 2 horas, seguido de resfriamento em dessecador e pesagem. A operação foi repetida até obtenção de peso constante. Os resultados de três determinações foram avaliados em termos de porcentagem ponderal sobre a quantidade da amostra, utilizando-se a equação abaixo:

$$\% \text{ perda} = \frac{Pu - Ps}{Pa} \times 100$$

$$\frac{Pu - Ps}{Pa}$$

Onde:

Pa = peso da amostra (g)

Pu = peso do pesa-filtro contendo a amostra antes da dessecação (g)

Ps = peso do pesa-filtro contendo a amostra após a dessecação (g)

#### 4.3.3 DETERMINAÇÃO DO TEOR DE CINZAS TOTAIS

A quantidade de substâncias residuais não voláteis no processo de incineração é determinada pelo teor de cinzas. Utilizando-se os pesos da droga vegetal antes e depois da incineração, obtém-se um valor que é utilizado para o cálculo da percentagem de cinzas em relação à droga seca ao ar.

Exatamente 3 g do pó foram transferidos para cadinho de porcelana, previamente calcinado, resfriado e tarado nas condições empregadas durante a análise propriamente dita. As amostras dos pós nos cadinhos foram então carbonizadas em mufla a 450°C por 2 horas. Após resfriamento em dessecador sob vácuo, as mesmas foram pesadas em balança analítica, repetindo-se o procedimento até a obtenção de peso constante. A porcentagem de cinzas, em triplicata, foi calculada em relação à droga seca.

#### 4.3.4 OBTENÇÃO DO PERFIL TÉRMICO DO PÓ DE *Pyrostegia venusta* (Ker Gawl.) Miers (SILVA JUNIOR, 2006b)

##### 4.3.4.1 Termogravimetria (TG)

As curvas TG foram obtidas na faixa de temperatura entre 25 e 700°C, utilizando termobalança modelo TG-60H, sob atmosfera dinâmica de nitrogênio (50 mL min<sup>-1</sup>), razão de aquecimento de 5°C min<sup>-1</sup>, utilizando cadinho de alumínio contendo massa de amostra em torno de 7 ± 0,5 mg. Os cálculos de perda de massa foram feitos com auxílio do programa TA-60WS da Shimadzu.

#### 4.3.4.2 Análise térmica diferencial (DTA)

Os mesmos procedimentos utilizados em TG. Os cálculos foram feitos com auxílio do programa TA-60WS da Shimadzu.

#### 4.3.4.3 Calorimetria exploratória diferencial (DSC)

As curvas DSC foram obtidas na faixa de temperatura entre 25 e 600°C, em célula calorimétrica modelo DSC-60, sob atmosfera dinâmica de nitrogênio (50 mL min<sup>-1</sup>), razão de aquecimento de 5°C min<sup>-1</sup> e utilizando cadinho de alumínio parcialmente fechadas contendo aproximadamente 7 ± 0,5 mg de amostra. As curvas DSC foram obtidas em atmosfera de nitrogênio devido à sensibilidade do sensor calorimétrico a atmosfera oxidante.

#### 4.3.5 OBTENÇÃO DO PERFIL ESPECTROSCÓPICO NA REGIÃO DO INFRAVERMELHO (SILVA JUNIOR, 2006b)

Para a obtenção do perfil espectroscópico na região do infravermelho (IV) da amostra de *P. venusta*, as leituras foram realizadas no comprimento de onda na faixa de 400 a 4000 cm<sup>-1</sup>. Onde quantidades apropriadas da droga vegetal foram comprimidas com brometo de potássio (KBr).

### 4.4 Obtenção da tintura de *Pyrostegia venusta* (Ker Gawl.) Miers

A tintura foi obtida por turbólise, utilizando-se 200 g da droga vegetal em 2000 mL de líquido extrator, durante 15 minutos. Em seguida, a mistura foi filtrada com funil de Büchner, previamente revestido com algodão e papel filtro, acoplado a um

Kitasato e uma bomba de vácuo. O sistema solvente empregado para a espécie foi uma mistura hidroetanólica 30% (v/v).

#### **4.5 Caracterização física e química da tintura de *Pyrostegia venusta* (Ker Gawl.) Miers (FARMACOPEIA BRASILEIRA 5ª ed., 2010)**

##### **4.5.1 DETERMINAÇÃO DA DENSIDADE APARENTE**

Um picnômetro com capacidade para 5 mL, previamente tarado, foi preenchido com o líquido padrão (água recém destilada e fervida) e pesado. Em seguida, o picnômetro foi preenchido com 5 mL da amostra (tintura) e pesado. A relação, em triplicata, entre o peso da amostra e do padrão em um volume fixo à temperatura de 25~28°C, forneceu o valor da densidade aparente da tintura.

##### **4.5.2 DETERMINAÇÃO DO pH**

A determinação do pH foi realizada em potenciômetro previamente calibrado com soluções tampão pH 4.0 e 7.0 e os resultados correspondem à média de três determinações.

##### **4.5.3 DETERMINAÇÃO DO TEOR DE SÓLIDOS**

Cerca de 1 g da tintura em solução foi pesado e transferido para pesa-filtro previamente tarado nas condições empregadas durante a análise propriamente dita. Posteriormente, o material foi levado à secura em placa aquecedora e dessecado em estufa, a 105°C, por duas horas. Após esse período, o pesa-filtro foi resfriado em

dessecador e pesado em balança analítica. O teor de sólidos foi calculado em relação a 100 g de tintura seca, pela média de três determinações.

#### **4.6 Obtenção do extrato bruto e frações de *Pyrostegia venusta* (Ker Gawl.)**

##### **Miers**

Adicionou-se 2000 mL da tintura de *Pyrostegia venusta* em balões de fundo redondo acoplados a um evaporador rotativo para concentração da tintura, evaporando-se o líquido extrator (mistura hidroetanólica) em pressão reduzida, com temperatura abaixo de 40°C. O concentrado aquoso resultante foi congelado em nitrogênio líquido e liofilizado. O produto obtido foi devidamente acondicionado a uma temperatura inferior a 2°C e ao abrigo da luz.

Para a obtenção das frações de *Pyrostegia venusta* foram pesados 30 g do extrato bruto liofilizado submetidos à partição líquido-líquido, em balão de decantação, com 300 mL de água destilada e 5 alíquotas de 300 mL de hexano até a obtenção de uma solução clara e límpida. Nessa etapa foram obtidas a fração hexânica e a fração aquosa que, em seguida, foram concentradas em evaporador rotativo, congeladas e liofilizadas. Esse mesmo procedimento foi realizado para mais dois solventes: acetato de etila e álcool n-butílico, respectivamente, para a obtenção das frações acetato de etila e n-butanólica. Todas essas frações foram concentradas em evaporador rotativo, congeladas, liofilizadas e acondicionadas da mesma maneira que o extrato bruto. A fração aquosa correspondeu à parte residual que não foi solubilizada em nenhum dos solventes.

Os marcadores acteosídeo e  $\beta$ -OH-verbascosídeo, previamente isolados da espécie em estudo, foram obtidos do laboratório de Farmacognosia da UEM.

#### 4.6.1 OBTENÇÃO DO PERFIL TÉRMICO DO EXTRATO BRUTO DE *Pyrostegia venusta* (Ker Gawl.) Miers (SILVA JUNIOR, 2006b)

##### 4.6.1.1 Termogravimetria (TG)

As curvas TG foram obtidas na faixa de temperatura entre 25 e 700°C, utilizando termobalança modelo TG-60H, sob atmosfera dinâmica de nitrogênio (50 mL min<sup>-1</sup>), razão de aquecimento de 5°C min<sup>-1</sup>, utilizando cadinho de alumínio contendo massa de amostra em torno de 7 ± 0,5 mg. Os cálculos de perda de massa foram feitos com auxílio do programa TA-60WS da Shimadzu.

##### 4.6.1.2 Análise térmica diferencial (DTA)

Os mesmos procedimentos utilizados em TG. Os cálculos foram feitos com auxílio do programa TA-60WS da Shimadzu.

##### 4.6.1.3 Calorimetria exploratória diferencial (DSC)

As curvas DSC foram obtidas na faixa de temperatura entre 25 e 600°C, em célula calorimétrica modelo DSC-60, sob atmosfera dinâmica de nitrogênio (50 mL min<sup>-1</sup>), razão de aquecimento de 5°C min<sup>-1</sup> e utilizando cadinho de alumínio parcialmente fechadas contendo aproximadamente 7 ± 0,5 mg de amostra. As curvas DSC foram obtidas em atmosfera de nitrogênio devido à sensibilidade do sensor calorimétrico a atmosfera oxidante.

#### 4.6.2 OBTENÇÃO DO PERFIL ESPECTROSCÓPICO NA REGIÃO DO INFRAVERMELHO (SILVA JUNIOR, 2006b)

Para a obtenção do perfil espectroscópico na região do IV da amostra de *P. venusta*, as leituras foram realizadas no comprimento de onda na faixa de 400 a 4000  $\text{cm}^{-1}$ . Onde quantidades apropriadas do extrato bruto foram comprimidas com brometo de potássio (KBr).

#### 4.6.3 PROSPECÇÃO QUÍMICA DO EXTRATO BRUTO DE *Pyrostegia venusta* (Ker Gawl.) Miers (BARBOSA, 2001)

Na prospecção química dos extratos brutos liofilizados, investigou-se qualitativamente a presença de metabólitos secundários, em triplicata, descritos a seguir.

##### Saponinas espumílicas

Foram dissolvidos 25 mg do extrato liofilizado em 5 mL de água destilada. Em seguida, diluídos para 15 mL e agitados vigorosamente durante 2 minutos em tubo fechado. Se camada de espuma permanecer estável por mais de 30 minutos, o resultado é considerado positivo.

##### Ácidos orgânicos

Foram dissolvidos 25 mg do extrato liofilizado em 5 mL de água destilada. Em seguida, transferiu-se 2 mL para um tubo de ensaio e adicionou-se reativo de Pascová (9 gotas da solução A para 1 gota da solução B), somente no momento em que foi usado, pois o reativo só é estável durante 5 a 10 minutos. Se houver descoloração do reativo, o resultado é positivo.

##### Açúcares redutores

Foram dissolvidos 25 mg do extrato liofilizado em 5 mL de água destilada e filtrados. Adicionaram-se 2 mL do reativo de Fehling A e do reativo de Fehling B.

Aqueceu-se em banho de água em ebulição durante 5 minutos. Se houver o aparecimento de um precipitado vermelho tijolo, o resultado é considerado positivo.

#### Polissacarídeos

Foram dissolvidos 25 mg do extrato liofilizado em 5 mL de água destilada e filtrados. Adicionaram-se 2 gotas de lugol. O aparecimento de coloração azul é indicativo de resultado positivo.

#### Proteínas e aminoácidos

Foram dissolvidos 15 mg do extrato liofilizado em 3 mL de água destilada e filtrada. Adicionou-se 0,5 mL de solução aquosa de ninhidrina 0,1% e aqueceu-se até ebulição. O aparecimento de coloração violeta persistente indica resultado positivo.

#### Fenóis e taninos

Foram dissolvidos 25 mg do extrato liofilizado em 5 mL de água destilada e filtrados. Adicionaram-se 2 gotas de solução alcoólica de  $\text{FeCl}_3$  1%. Qualquer mudança na coloração ou formação de precipitado é indicativa de reação positiva, quando comparado com o teste em branco. Coloração inicial entre o azul e o vermelho é indicativa da presença de fenóis, quando o teste em branco for negativo; precipitado escuro de tonalidade azul indica presença de taninos pirogálicos; e verde presença de taninos catéquicos.

#### Flavonoides

Foram dissolvidos 25 mg do extrato liofilizado em 5 mL de metanol e filtrados. Adicionaram-se 5 gotas de HCl concentrado e raspas de magnésio. O surgimento de uma coloração rósea na solução indica reação positiva.

#### Glicosídeos cardíacos

Foram dissolvidos 25 mg do extrato liofilizado em 5 mL de metanol e filtrados. Separou-se em duas porções de 2 mL cada e adicionou-se gotas do reativo de Keede. O aparecimento de coloração azul ou violeta indica reação positiva.

### Catequinas

Foram dissolvidos 15 mg do extrato liofilizado em 3 mL de metanol e filtrados. Juntou-se 1 mL de solução aquosa de vanilina a 1% e 1 mL de HCl concentrado. O surgimento de uma coloração vermelha intensa indica reação positiva.

### Derivados benzoquinonas, naftoquinonas e fenantraquinonas

Foram dissolvidos 15 mg do extrato liofilizado em 3 mL de metanol e filtrados. Adicionaram-se 2 gotas de  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  a 25%, 2 gotas de formaldeído a 4% e 2 gotas de o-dinitrobenzeno a 5%. Aqueceu-se a mistura em banho-maria. A coloração violeta indica reação positiva.

### Lactonas sesquiterpênicas e outras lactonas

Foram dissolvidos 15 mg do extrato liofilizado em 3 mL de metanol e filtrados. Adicionaram-se 12 gotas de solução alcoólica de cloridrato de hidroxilamina 10% e 2 gotas de solução metanólica de KOH a 10%. Aqueceu-se suavemente em banho-maria durante 2 minutos. Em seguida, resfriou-se e acidulou-se com solução de HCl a 1N e adicionou-se 1 gota de  $\text{FeCl}_3$  1%. O surgimento de uma coloração violeta indica reação positiva.

### Esteroides e triterpenoides

Foram dissolvidos 50 mg do extrato liofilizado em 10 mL de clorofórmio e filtrados sobre carvão ativado. Transferiu-se o filtrado para um tubo de ensaio completamente seco e adicionou-se 1 mL de anidrido acético e agitou-se suavemente. Em seguida, adicionaram-se, cuidadosamente, 3 gotas de  $\text{H}_2\text{SO}_4$  concentrado e agitou-se novamente. O rápido desenvolvimento de cores, que vão do azul evanescente ao verde persistente, indicam resultado positivo.

### Azulenos

Foram dissolvidos 10 mg do extrato liofilizado em 2 mL de clorofórmio e filtrados. Concentrou-se até 0,5 mL em banho-maria e adicionou 2,5 mL da solução p-dimetilaminobenzaldeído. Aqueceu-se em banho-maria por 5 minutos e, após esfriar em um funil de decantação, agitou-se com 10 mL de éter de petróleo. Após as duas fases ficarem distintas, observou-se a fase aquosa. Se houver presença de

proazulenos, a fase aquosa adquire coloração azul, porém, quando estes estão em pequena quantidade, a coloração observada é esverdeada.

#### Carotenoides

Foram dissolvidos 15 mg do extrato liofilizado em 2 mL de clorofórmio e filtrados. Juntou-se 2 mL de clorofórmio saturado com tricloreto de antimônio. O aparecimento da coloração azul indica resultado positivo.

#### Alcaloides

Foram dissolvidos 25 mg do extrato liofilizado em 5 mL de solução de HCl a 5% e filtrados. Separaram-se quatro porções de 1 mL em placa de toque e adicionaram-se 3 gotas dos reativos de Bouchardat, Dragendorff e Mayer. Precipitação ou turvação em pelo menos um tubo é indicativa de resultado positivo.

#### Purinas

Numa cápsula de porcelana, juntou-se 5 mg do extrato liofilizado, 3 gotas de solução de HCl 6N e 2 gotas de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (30%) e evaporou-se em banho-maria até a formação de um resíduo corado de vermelho. Juntaram-se 3 gotas de solução de NH<sub>4</sub>OH (6N). O surgimento de coloração violeta indica reação positiva.

#### Depsídeos e depsidonas

Foram dissolvidos 25 mg do extrato liofilizado em 5 mL de éter etílico e filtrados. Evaporou-se todo o éter em banho-maria e juntou-se ao resíduo 3 mL de metanol. Após agitação, adicionaram-se 3 gotas de solução de FeCl<sub>3</sub> a 1%. O aparecimento de coloração verde, azul ou cinza indica reação positiva.

#### Derivados da cumarina

Foram dissolvidos 25 mg do extrato liofilizado em 5 mL de éter etílico e concentrados em banho-maria até 0,5 mL. Em papel filtro, aplicaram-se gotas da solução etérea, de modo que se formaram duas manchas de aproximadamente 1 cm de diâmetro cada. A uma destas, adicionou-se 1 gota de solução de NaOH a 1N. Cobriu-se a metade da mancha com papel escuro, e expôs-se a outra metade a luz ultravioleta. Descobriu-se e compararam-se as manchas. O aparecimento de fluorescência azul na parte exposta da mancha indica reação positiva.

### Antraquinonas

Foram dissolvidos 25 mg do extrato liofilizado em 5 mL de tolueno e filtrados. Adicionaram-se 2 mL de solução de NH<sub>4</sub>OH a 10% e agitou-se suavemente. O aparecimento de coloração rósea, vermelha ou violeta na fase aquosa, indica reação positiva.

#### **4.7 Avaliação da citotoxicidade do extrato bruto e frações de *Pyrostegia venusta* (Ker Gawl) Miers em células mononucleares do sangue periférico (PBMC)**

Foram coletados 10 mL de sangue em tubo de ensaio heparinizado. Em seguida o sangue foi diluído na proporção 1:1 em solução salina tampão fosfato (PBS), a solução foi então adicionada lentamente pela parede de um tubo de 50 mL sobre reagente de separação por gradiente Ficoll-paque na proporção de 20 mL de sangue para 12 mL de Ficoll e em seguida as PBMC foram isoladas após centrifugação por 30 minutos a 1500 rpm. O método utilizado foi o de Vissers e colaboradores (1988) parcialmente modificado. Após o isolamento, as células foram ressuspensas em 5 mL de meio RPMI incompleto.

Foi realizada a coloração das células com 50 µL de *Trypan Blue* e 50 µL de células em meio RPMI incompleto. Uma alíquota dessa mistura foi dispensada na câmara de *Neubauer* e foi feita a contagem de células no microscópio com objetiva 40x. Após a contagem, o tubo contendo as células ressuspensas com RPMI incompleto foi centrifugado e as células foram ressuspensas com meio RPMI completo (RPMI, soro fetal bovino e antibiótico). A quantidade (em mL) de RPMI completo foi calculada com base na quantidade de células contadas na câmara de *Neubauer*.

Em uma placa de 96 poços foram adicionados 10 µL de extrato bruto/frações de *Pyrostegia venusta* na concentração de 1000 µg/mL e 100 µL de meio RPMI completo contendo as células mononucleares  $5 \times 10^5$  células/mL, assim foram adicionados  $5 \times 10^4$  célula por poço. Em seguida, a placa de 96 poços foi incubada em estufa com 5% de CO<sub>2</sub>, durante 24 horas. Após o período de incubação foram coletadas amostras de 50 µL de cada poço e misturadas com 50 µL de *Trypan Blue*

para realizar a coloração das células. Em seguida, essa mistura foi dispensada na câmara de *Neubauer* e foi feita a contagem de células totais, viáveis e não viáveis de cada poço no microscópio com objetiva 40x. Como controle positivo foi considerado as células em meio RPMI completo sem nenhum tratamento (MELO *et al.*, 2003).

#### **4.8 Cultura celular e preparação dos ensaios em macrófagos RAW 264.7**

Macrófagos murinos da linhagem celular RAW 264.7 obtidos da *American Type Culture Collection*, Rockville (ATCC), foram cultivados em meio Dulbecco's Modified Medium F-12 (DMEM F-12), suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB) em estufa à 37°C e 5% de CO<sub>2</sub>. Células RAW 264.7 (2×10<sup>5</sup> células/mL) foram plaqueadas em microplaca de 96 poços e mantidas em incubadora por 3 horas para aderência dos macrófagos e estabilidade da cultura. Após este período, o sobrenadante da cultura foi removido cuidadosamente para retirada de células não aderentes e substituído por DMEM-F12 suplementado com 2% de SFB contendo ou não lipolissacarídeo, [1 µg/mL] (LPS, *Escherichia coli* 055:B5; Sigma-Aldrich, USA) na presença ou ausência das amostras vegetais nas concentrações de 0,8, 4,0, 20 e 100 µg/mL e utilizando 1% de Triton X-100 como controle positivo de ação citotóxica. Como controle negativo da ação citotóxica foi considerado as células estimuladas com LPS. Após 24h em incubação de 37°C, 5% CO<sub>2</sub>, o sobrenadante da cultura foi coletado para avaliação quanto à capacidade de inibição da produção de óxido nítrico (NO).

#### **4.9 Avaliação da citotoxicidade do extrato bruto e frações de *Pyrostegia venusta* (Ker Gawl) Miers em macrófagos murinos RAW 264.7**

Após o tempo de incubação e a retirada dos sobrenadantes da cultura 5 µL de 3-(4,5 dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil tetrazol (MTT, 5 mg/mL) foi adicionado em cada

poço e 2 horas depois o sobrenadante da placa foi removido e os cristais formados foram solubilizados por HCl (4mM) adicionado em isopropanol. A absorbância foi obtida a 570 nm.

#### **4.10 Avaliação da atividade imunomoduladora do extrato bruto e frações de *Pyrostegia venusta* (Ker Gawl.) Miers através da dosagem de NO**

A produção de NO foi estimada indiretamente, medindo-se a concentração de nitrito no sobrenadante através de uma curva de referência com nitrito de sódio. 50 µL dos sobrenadantes foram transferidos para uma nova microplaca e adicionados 50 µL de reagente de Griess (p-aminobenzenosulfonamida 1% + diidrocloreto de naftiletilenodiamino 0,1% em 5% de ácido fosfórico, Sigma Chemical Co.), recém-preparado (Griess, 1939; Chi, *et al.*, 2001). Após 10 min, a absorbância foi medida no comprimento de onda de 540 nm em espectrofotômetro de placa. Como controle negativo, os macrófagos foram estimulados com LPS na concentração de 1 µg/mL e tratados com inibidor não-específico de óxido nítrico sintase (L-NMMA à 20 µg/mL). Como controle positivo foi utilizado macrófagos estimulados com LPS à 1 µg/mL e não tratados com inibidor inespecífico ou compostos vegetais.

#### **4.11 Avaliação da atividade antimicrobiana do extrato bruto, frações e marcadores acteosídeo e β-OH-verbascosídeo de *Pyrostegia venusta* (Ker Gawl.) Miers**

##### **4.11.1 DILUIÇÃO DOS EXTRATOS E MARCADORES**

Para a realização dos testes de atividade antimicrobiana, foram utilizados o extrato bruto liofilizado e frações de *Pyrostegia venusta* diluídos em água destilada para obter uma concentração de 20 mg/mL. Em seguida, foi realizada diluição de 1:10 em meio de cultura para a obtenção da concentração de 2000 µg/mL. Os

marcadores acteosídeo e  $\beta$ -OH-verbascosídeo foram diluídos em água destilada para obter uma concentração de 2 mg/mL. Em seguida, foi realizada diluição de 1:10 em meio de cultura para a obtenção da concentração de 200  $\mu$ g/mL (HOLETZ *et al.*, 2002).

#### 4.11.2 PREPARO DOS MEIOS DE CULTURA

Os meios de cultura utilizados foram ágar e caldo Müller-Hinton, TSB com extrato de levedura 10% e Sabouraud. Esses meios foram preparados conforme as instruções do fabricante.

#### 4.11.3 OBTENÇÃO E MANUTENÇÃO DAS CEPAS

Os microrganismos utilizados neste estudo foram bactérias ATCC: Gram-positivas *Streptococcus mutans* (ATCC 25175), *Streptococcus mitis* (ATCC 49456) e *Streptococcus oralis* (ATCC 10557); e o fungo leveduriforme *Candida albicans* (ATCC 0175), oriundos do Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde (INCQS) da Fundação Oswaldo Cruz (FIOCRUZ).

Os microrganismos foram viabilizados em caldo Müller-Hinton e incubados: as bactérias a 35°C por 24 horas em microaerofilia (10 % de CO<sub>2</sub>), e a levedura a 25°C por 48 horas. Em seguida, os microrganismos foram semeados em placas de Petri em meios de cultura específicos para cada espécie. Para as bactérias utilizou-se ágar TSB com extrato de levedura 10% e para a levedura utilizou-se ágar Sabouraud dextrose. Em seguida, as placas foram incubadas nas mesmas condições descritas anteriormente. (CLSI, 2003a,b).

#### 4.11.4 PREPARO DOS INÓCULOS

Após o período de incubação, foram preparados inóculos dos microrganismos tomando-se 3 a 4 colônias isoladas do meio de cultura específico de cada espécie e diluídas em 3 mL de solução salina 0,9% até atingir a turbidez correspondente ao tubo 0,5 da escala de McFarland, correspondendo aproximadamente a  $1,5 \times 10^8$  UFC/mL (unidades formadoras de colônias por mL) (BAUER *et al.*, 1966; CLSI, 2003a).

#### 4.11.5 TESTE DE MICRODILUIÇÃO EM CALDO

Numa placa de 96 poços, foram adicionados 100  $\mu$ L de extrato bruto/frações de *Pyrostegia venusta* na concentração de 2000  $\mu$ g/mL nos primeiros poços contendo 100  $\mu$ L de meio de cultura específico para cada microrganismo. Para os marcadores acteosídeo e  $\beta$ -OH-verbascosídeo foram adicionados 100  $\mu$ L na concentração de 200  $\mu$ g/mL. Em seguida, 100  $\mu$ L dessa mistura foram retirados do poço A e colocados no poço B e, assim, sucessivamente até o poço G. Por fim, 10  $\mu$ L de inóculo foram adicionados em todos os poços. O poço H não recebeu extrato bruto/frações/marcadores, pois serviu como controle positivo para o crescimento de microrganismos. As placas foram incubadas (HOLETZ *et al.*, 2002; CLSI, 2003b).

#### 4.11.6 DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO INIBITÓRIA MÍNIMA (CIM) E BACTERICIDA MÍNIMA (CBM) E FUNGICIDA MÍNIMA (CFM)

Após o período de incubação realizou-se a leitura das placas, onde os microrganismos dos poços que apresentaram turvação foram considerados resistentes ao extrato bruto/frações/marcadores e dos poços que não apresentaram turvação foram considerados sensíveis aos mesmos. Em seguida, amostras de 10  $\mu$ L do poço anterior, do posterior e do que não apresentou turvação foram

semeadas, em triplicata, em placas de Petri contendo ágar específico para cada microrganismo. As placas foram incubadas (HOLETZ *et al.*, 2002; CLSI, 2003b).

A CIM, portanto, correspondeu a menor concentração do extrato bruto/frações/marcadores que impediu o crescimento visível dos microrganismos e não houve o crescimento de mais de 10 unidades formadoras de colônia (UFC) de bactérias/levedura no ágar contendo meio de cultura específico. Já a CBM/CFM correspondeu a menor concentração do extrato bruto/frações/marcadores que impediu o crescimento visível dos microrganismos e não houve o crescimento no ágar contendo meio de cultura específico (HOLETZ *et al.*, 2002; CLSI, 2003b).

#### 4.11.7 TESTE DE ADERÊNCIA EM LAMÍNULA DE VIDRO

O método utilizado foi o de Hamada e colaboradores (1981) parcialmente modificado. *Streptococcus mutans* foram semeados e incubados em caldo específico, cetrifugados por 20 minutos e ressuspensos com solução tampão para o preparo dos inóculos. Uma amostra dessa suspensão bacteriana (1,5 mL) foi adicionada a solução tampão (1,5 mL) e outra amostra (1,5 mL) foi adicionada ao extrato bruto/frações (1,5 mL) na CIM. Os tubos foram incubados por 4 horas, cetrifugados e ressuspensos em caldo + sacarose (3 mL). Diluições seriadas foram feitas:  $10^{-1}$  e  $10^{-2}$ . A diluição  $10^{-2}$  (500  $\mu$ L) foi adicionada a uma placa de 24 poços onde havia uma lamínula de vidro. A placa de 24 poços foi incubada por 2 horas. Em seguida, as lamínulas de vidro foram removidas e lavadas com solução tampão e colocadas em outra placa de 24 poços. Ágar específico (500  $\mu$ L) foi adicionado em cima de cada lamínula e a placa de 24 poços foi incubada. As UFC foram contadas após 24 horas de incubação, em triplicata. Controle positivo, clorexidina. (SASAKI *et al.*, 2007).

#### 4.11.8 EFEITO DOS EXTRATOS NA PRODUÇÃO DE ÁCIDOS

O método utilizado foi o de Ooshima e colaboradores (2000) parcialmente modificado. *Streptococcus mutans* foram semeados (1 mL do inóculo em 100 mL de caldo contendo vermelho de fenol, TSB com extrato de levedura 10%, glicose 1% e o extrato bruto/frações) e incubados. Em intervalos regulares de tempo, retirou-se 4 mL da cultura e verificou-se o pH em potenciômetro previamente calibrado. Controle positivo, clorexidina (SASAKI *et al.*, 2007).

#### 4.11.9 EFEITO DOS EXTRATOS NO BROTAMENTO DE *Candida albicans*

*Candida albicans* foram incubadas, nas mesmas condições descritas anteriormente, e o inóculo preparado. Em uma placa de 24 poços foram adicionados 500 µL de meio RPMI com MOPS (pH 6.7), 500 µL de extrato bruto/frações na CIM e 100 µL de inóculo. A placa foi incubada por um período de 2 a 3 horas. Em seguida, uma amostra de cada poço foi misturada com tinta nanquim para a coloração das células e preparou-se um esfregaço em lâminas de microscopia. O número de células totais, com brotamento e sem brotamento foram contadas em microscópio com objetiva 40x, em triplicata (figura 1). Controle negativo, células em meio RPMI (ISHIDA *et al.*, 2006).

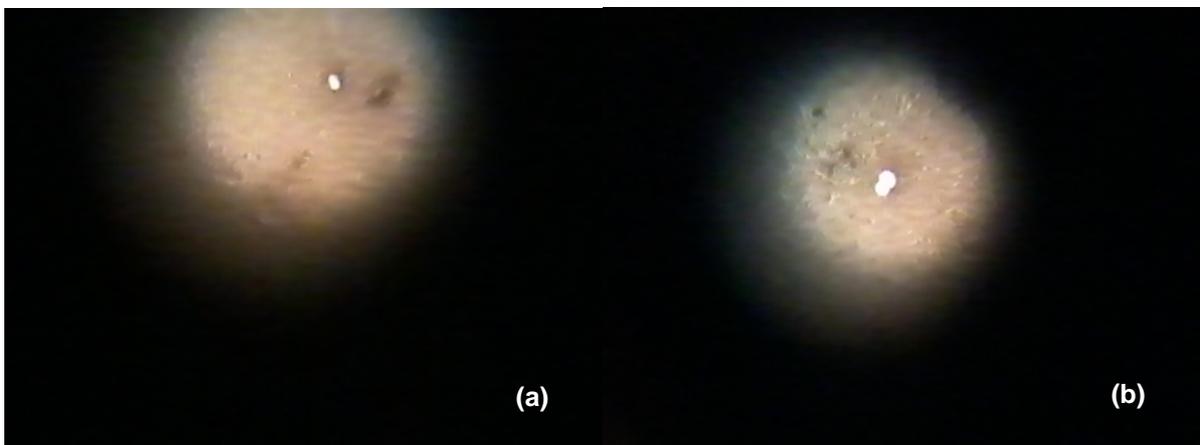


Figura 4: Leitura das lâminas em microscópio óptico com objetiva 40x demonstrando células de *Candida albicans* sem brotamento (a) e com brotamento (b)

## **5 RESULTADOS**

## 5 RESULTADOS

### 5.1 Caracterização física e química do pó de *Pyrostegia venusta* (Ker Gawl.) Miers

#### 5.1.1 DETERMINAÇÃO DA DISTRIBUIÇÃO GRANULOMÉTRICA

Na análise granulométrica observou-se que as partículas do pó de *Pyrostegia venusta* passaram em quase sua totalidade pelo tamis com abertura nominal de malha de 1,70 mm e, no máximo, 40% pelo tamis com abertura nominal de malha de 355  $\mu\text{m}$ , caracterizando-o como pó grosso, segundo a Farmacopeia Brasileira 5ª ed. (2010).

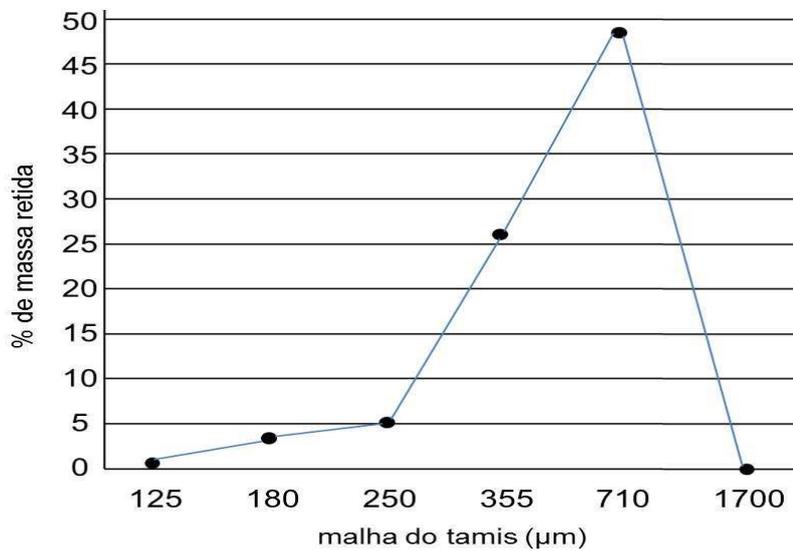


Figura 5: Distribuição granulométrica do pó de *Pyrostegia venusta*

### 5.1.2 DETERMINAÇÃO DA PERDA POR DESSECAÇÃO

A perda por dessecação foi de 9,46% com base na média de três determinações (tabela 1).

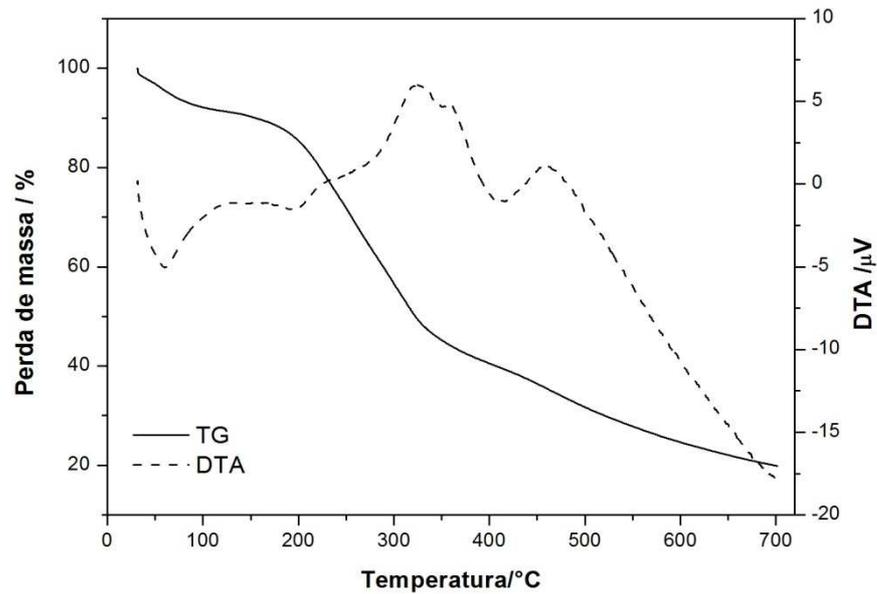
### 5.1.3 DETERMINAÇÃO DO TEOR DE CINZAS TOTAIS

O teor de cinzas totais foi de 9,87% obtido com base na média de três determinações (tabela 1).

Tabela 1: Determinação de perda por dessecação e teor de cinzas totais do pó de *Pyrostegia venusta* (Ker Gawl.) Miers

Determinações	Resultados
Perda por Dessecação	9,46 ± 0,29%
Teor de cinzas totais	9,87 ± 0,14%

## 5.1.4 TERMOGRAVIMETRIA (TG) E ANÁLISE TÉRMICA DIFERENCIAL (DTA)

Figura 6: Curvas TG e DTA do pó de *Pyrostegia venusta*Tabela 2: Perfil termogravimétrico do pó de *Pyrostegia venusta*

$\Delta$ Temperatura (°C)	$\Delta$ massa (%)
30-150	9,435
151-400	49,870
401-700	20,620

### 5.1.5 CALORIMETRIA EXPLORATÓRIA DIFERENCIAL (DSC)

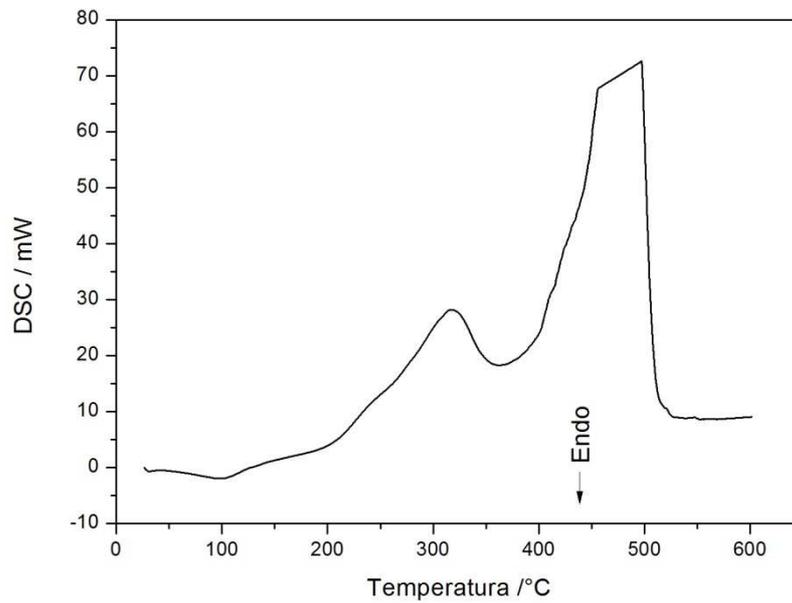


Figura 7: Curva DSC do pó de *Pyrostegia venusta*

Tabela 3: Perfil de calorimetria exploratória diferencial do pó de *Pyrostegia venusta*

Temperatura (°C)	$\Delta H$ (kJ/g)	Evento
315,26	4,87	Exotérmico
450,39	6,98	Exotérmico

### 5.1.6 PERFIL ESPECTROSCÓPICO NA REGIÃO DO INFRAVERMELHO (IV)

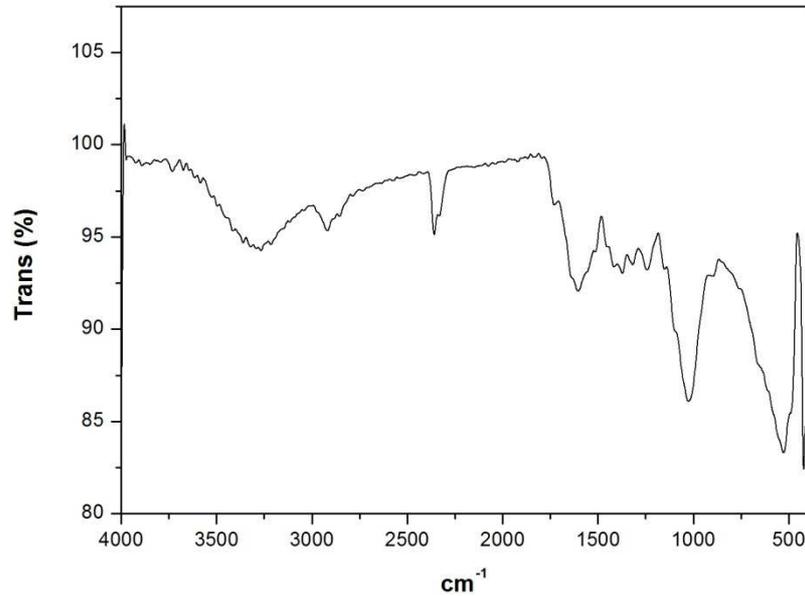


Figura 8: Espectro na região do infravermelho do pó de *Pyrostegia venusta*

Tabela 4: Número de onda ( $\text{cm}^{-1}$ ) e suas respectivas ligações características no espectro da região do infravermelho para o pó de *Pyrostegia venusta*

Região de absorção ( $\text{cm}^{-1}$ )	Tipo de ligação
3238	O-H
2926	C-H

## 5.2 Caracterização física e química da tintura de *Pyrostegia venusta* (Ker Gawl.) Miers

### 5.2.1 DETERMINAÇÃO DA DENSIDADE APARENTE

A densidade aparente foi de 0,89 g/mL obtida com base na média de três determinações (tabela 5).

### 5.2.2 DETERMINAÇÃO DO pH

O valor do pH foi 5.0 obtido com base na média de três determinações (tabela 5).

### 5.2.3 DETERMINAÇÃO DO TEOR DE SÓLIDOS

O percentual de resíduo seco foi de  $4,50 \pm 0,2\%$  obtido com base na média de três determinações (tabela 5).

Tabela 5: Determinação da densidade aparente, pH e teor de sólidos da tintura de *Pyrostegia venusta* (Ker Gawl) Miers

Determinações	Resultados
Densidade aparente	$0,89 \pm 0,02$ g/mL
pH	$5,0 \pm 0,03$
Teor de sólidos	$4,5 \pm 0,2\%$

### 5.3 Obtenção do extrato bruto e frações de *Pyrostegia venusta* (Ker Gawl.) Miers

A partir de 200 g da droga vegetal foram obtidos 48 g de extrato bruto liofilizado, rendimento de 24% em relação à droga vegetal. O rendimento da partição líquido-líquido partindo-se de 30 g do extrato bruto foi de 0,5 g (1,6%) de fração hexânica, 2,7 g (9,0%) de fração acetato de etila, 3,9 g (11,7%) de fração n-butanólica e 18,4 g (61,3%) de fração aquosa ou residual, com uma perda de 15% durante o processo (figura 8).

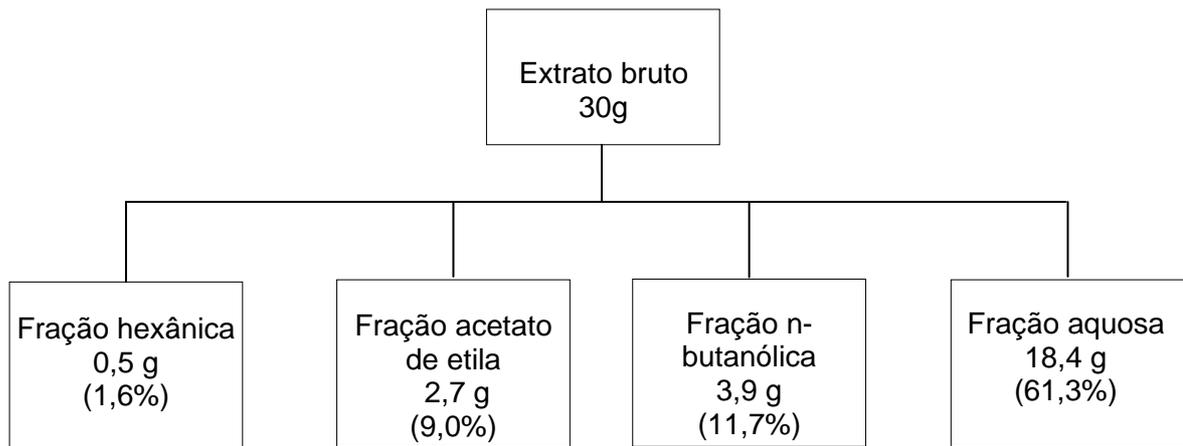


Figura 9: Rendimento em gramas e em porcentagem da partição líquido – líquido

#### 5.4 Perfil térmico do extrato bruto liofilizado de *Pyrostegia venusta* (Ker Gawl.) Miers

##### 5.4.1 TERMOGRAVIMETRIA (TG) E ANÁLISE TÉRMICA DIFERENCIAL (DTA)

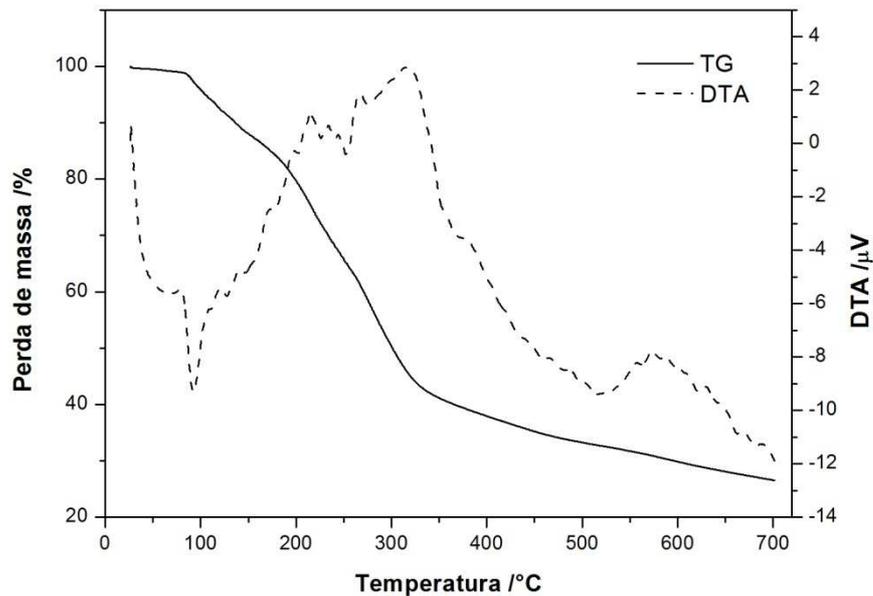
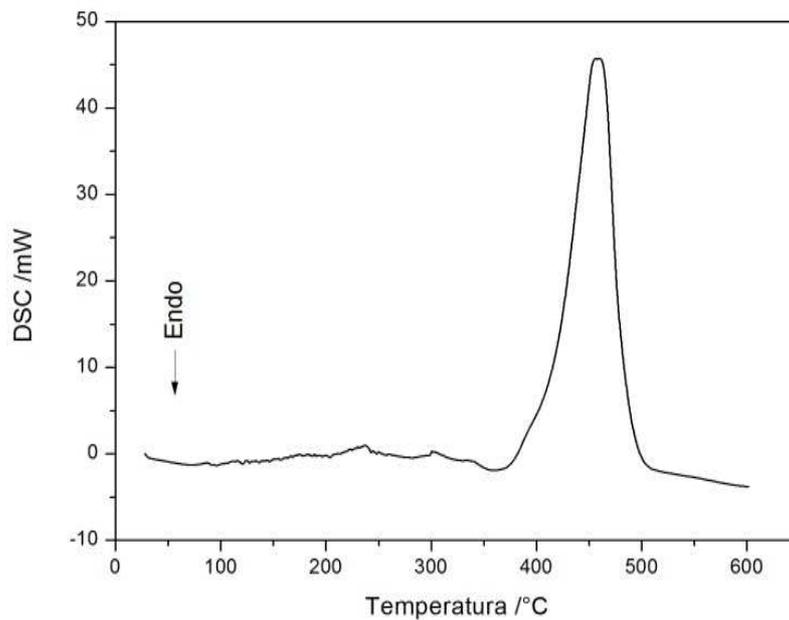


Figura 10: Curvas TG e DTA do extrato bruto liofilizado de *Pyrostegia venusta*

Tabela 6: Perfil termogravimétrico do extrato bruto liofilizado de *Pyrostegia venusta*

$\Delta$ Temperatura (°C)	$\Delta$ massa (%)
85-170	12,812
171-400	47,860
401-700	11,240

#### 5.4.2 CALORIMETRIA EXPLORATÓRIA DIFERENCIAL (DSC)

Figura 11: Curvas DSC do extrato bruto liofilizado de *Pyrostegia venusta*Tabela 7: Perfil de calorimetria exploratória diferencial do extrato bruto liofilizado de *Pyrostegia venusta*

Temperatura (°C)	$\Delta$ H (kJ/g)	Evento
461,67	1,13	Exotérmico

### 5.4.3 PERFIL ESPECTROSCÓPICO NA REGIÃO DO INFRAVERMELHO (IV)

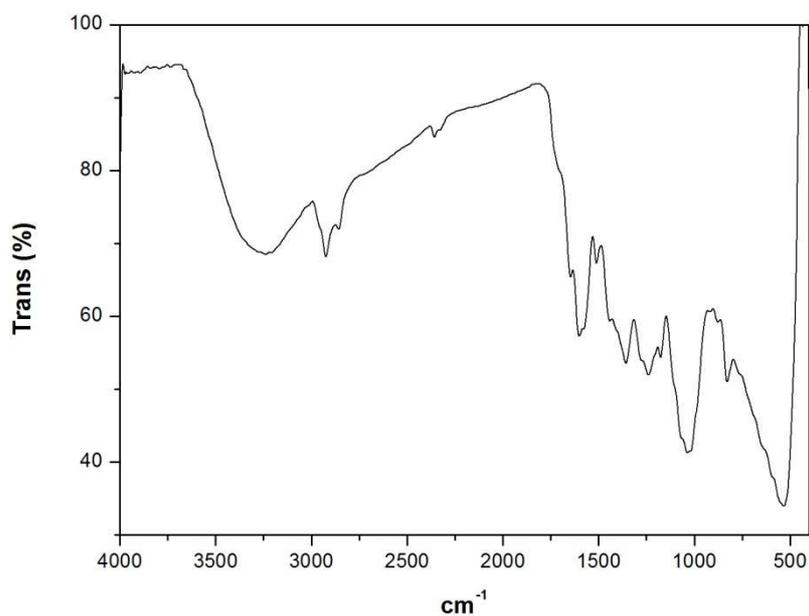


Figura 12: Espectro na região do infravermelho do extrato bruto liofilizado de *Pyrostegia venusta*

Tabela 8: Número de onda ( $\text{cm}^{-1}$ ) e suas respectivas ligações características no espectro da região do infravermelho para o extrato bruto liofilizado de *Pyrostegia venusta*

Região de absorção ( $\text{cm}^{-1}$ )	Tipo de ligação
3238	O-H
2926	C-H

### 5.5 Prospecção química do extrato bruto de *Pyrostegia venusta* (Ker Gawl) Miers

O resultado da prospecção química do extrato bruto de *Pyrostegia venusta* encontra-se na tabela 9.

Tabela 9: Prospecção química do extrato bruto (EB) de *Pyrostegia venusta*

Classe de metabólito secundário	EB
Ácidos orgânicos	-
Saponinas espumídicas	+
Açúcares redutores	-
Polissacarídeos	-
Proteínas e aminoácidos	+
Fenóis e taninos	+
Flavonoides	-
Glicosídeos cardíacos	-
Catequinas	-
Deriv. de benzoquinonas, naftoquinonas e fenantraquinonas	-
Lactonas sesquiterpênicas e outras	-
Esteroides e triterpenoides	-
Azulenos	+
Carotenoides	-
Alcaloides	-
Purinas	-
Depsídeos e depsidonas	-
Derivados da cumarina	-
Antraquinonas	-

### 5.6 Avaliação da citotoxicidade do extrato bruto e frações de *Pyrostegia venusta* (Ker Gawl) Miers em PBMC

O extrato bruto foi o mais citotóxico, pois 58,3% das células não foram viáveis. Já a fração acetato de etila foi a menos citotóxica, apresentando 76,1% de células viáveis (tabela 10).

Tabela 10: Avaliação da citotoxicidade do extrato bruto (EB), fração hexânica (FH), fração acetato de etila (FAE), fração n-butanólica (FNB) e fração aquosa (FAQ) de *Pyrostegia venusta* em células mononucleares do sangue periférico (PBMC)

Extrato/Frações	Células viáveis	Células não viáveis
EB	41,6 ± 1,05%	58,3 ± 1,23%
FH	52,1 ± 1,97%	47,8 ± 1,83%
FAE	76,1 ± 1,74%	23,8 ± 1,41%
FNB	70 ± 1,33%	30 ± 1,52%
FAQ	44,8 ± 1,76%	55,1 ± 1,69%
Controle positivo	87,5 ± 1,08%	12,5 ± 1,34%

### 5.7 Avaliação da citotoxicidade do extrato bruto e frações de *Pyrostegia venusta* (Ker Gawl) Miers em macrófagos murinos RAW 264.7 pelo ensaio de MTT

Não observamos ação citotóxica do extrato ou frações de *Pyrostegia venusta* sobre macrófagos murinos RAW 264.7 utilizando o ensaio do MTT (tabela 11).

Tabela 11: Avaliação da citotoxicidade do extrato bruto (EB), fração hexânica (FH), fração acetato de etila (FAE), fração n-butanólica (FNB) e fração aquosa (FAQ) de *Pyrostegia venusta* em células RAW 264.7 pelo ensaio de MTT

Extrato/Frações	Células viáveis	Absorbância
EB	100,0 ± 2,03%	0,66 ± 0,22%
FH	100,0 ± 6,52%	0,65 ± 0,06%
FAE	100,0 ± 5,47%	1,35 ± 0,55%
FNB	100,0 ± 7,33%	1,28 ± 0,73%
FAQ	100,0 ± 3,70%	0,96 ± 0,04%
Controle Triton x-100	9,23 ± 1,06%	0,15 ± 0,01%
Controle célula	100,0 ± 1,10%	0,62 ± 0,11%

## 5.8 Avaliação da atividade imunomoduladora do extrato bruto e frações de *Pyrostegia venusta* (Ker Gawl.) Miers através da dosagem de NO

As frações acetato de etila e n-butanólica foram capazes de inibir a produção de óxido nítrico por macrófagos estimulados com LPS numa concentração de 100 µg/mL. Já o extrato bruto e as demais frações não apresentaram capacidade de inibição nas concentrações utilizadas (figura 13).

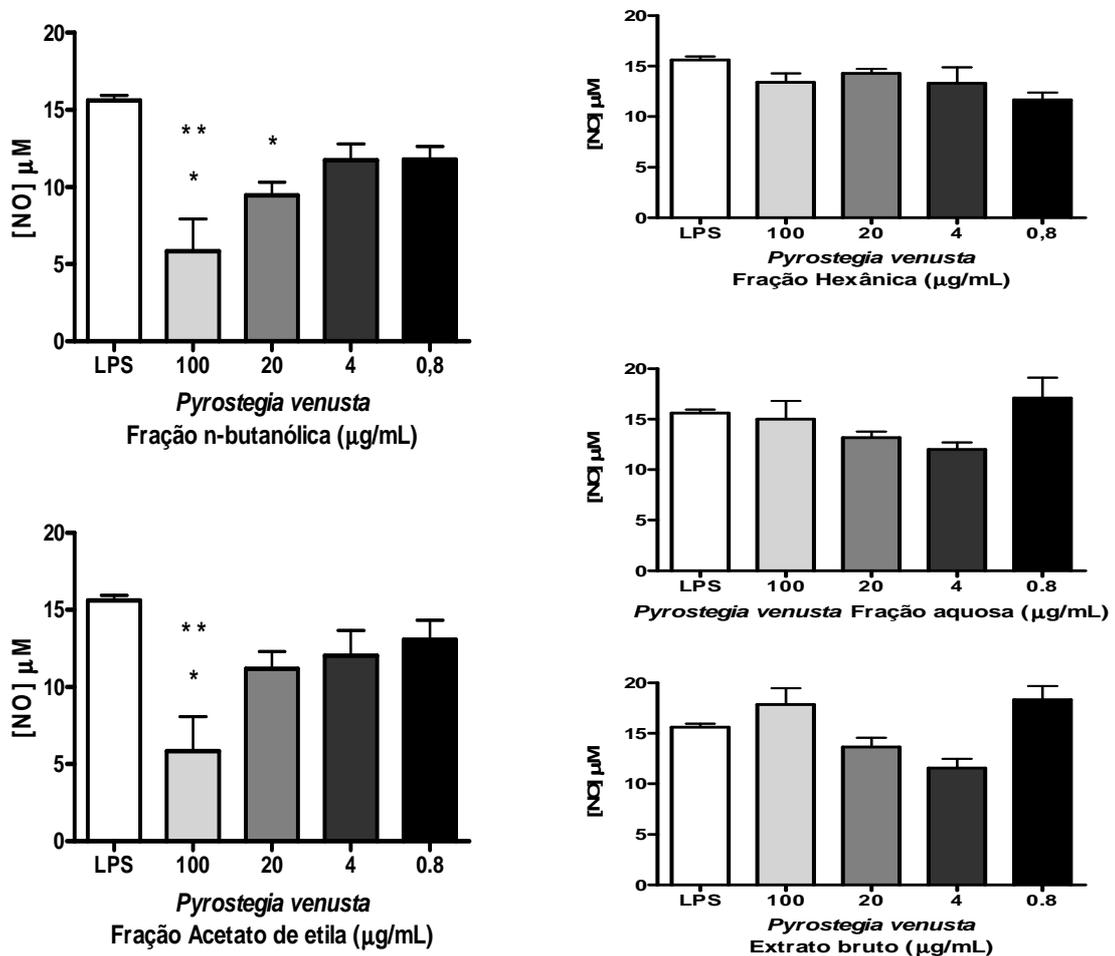


Figura 13: Inibição da produção de NO por macrófagos murinos estimulados com LPS pelo extrato bruto, fração hexânica, fração acetato de etila, fração n-butanólica e fração aquosa de *Pyrostegia venusta*

## 5.9 Avaliação da atividade antimicrobiana do extrato bruto, frações e marcadores acteosídeo e $\beta$ -OH-verbascosídeo de *Pyrostegia venusta* (Ker Gawl.) Miers

### 5.9.1 TESTE DE MICRODILUIÇÃO EM CALDO, CIM, CBM E CFM

O extrato bruto e frações hexânica, acetato de etila, n-butanólica e aquosa apresentaram CIM de 500 a 1000  $\mu\text{g/mL}$  frente aos microrganismos testados. Já ambos os marcadores, acteosídeo e  $\beta$ -OH-verbascosídeo, apresentaram CIM de 100  $\mu\text{g/mL}$  frente a todos os microrganismos testados. O extrato bruto, fração acetato de etila e fração n-butanólica apresentaram CBM/CFM de 1000  $\mu\text{g/mL}$  frente às bactérias e  $> 1000 \mu\text{g/mL}$  frente a *Candida albicans*. A fração hexânica apresentou CBM/CFM  $> 1000 \mu\text{g/mL}$  frente a todos os microrganismos testados, e a fração aquosa apresentou CBM/CFM de 1000  $\mu\text{g/mL}$  frente a *Streptococcus mitis* e *Streptococcus oralis* e  $> 1000 \mu\text{g/mL}$  frente a *Streptococcus mutans* e *Candida albicans*. Já ambos os marcadores apresentaram CBM/CFM  $> 100 \mu\text{g/mL}$  frente a todos os microrganismos testados.

Tabela 12: CIM e CBM do extrato bruto (EB), fração hexânica (FH), fração acetato de etila (FAE), fração n-butanólica (FB), fração aquosa (FAQ) de *Pyrostegia venusta* contra *Streptococcus mutans* em diferentes concentrações

Concentração $\mu\text{g/mL}$	<i>Streptococcus mutans</i>				
	EB	FH	FAE	FNB	FAQ
1000	CBM	CIM	CBM	CBM	CIM
500	CIM	-	CIM	CIM	-
250	-	-	-	-	-
125	-	-	-	-	-
62,5	-	-	-	-	-
31,2	-	-	-	-	-
15,6	-	-	-	-	-
Controle	-	-	-	-	-

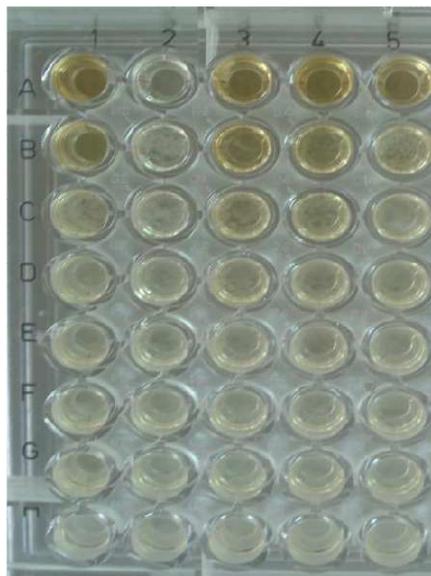


Figura 14: Atividade antimicrobiana do extrato bruto (1), fração hexânica (2), fração acetato de etila (3), fração n-butanólica (4), fração aquosa (5) de *Pyrostegia venusta* contra *Streptococcus mutans* em diferentes concentrações na placa de 96 poços

Tabela 13: CIM e CBM do extrato bruto (EB), fração hexânica (FH), fração acetato de etila (FAE), fração n-butanólica (FB), fração aquosa (FAQ) de *Pyrostegia venusta* contra *Streptococcus mitis* em diferentes concentrações

Concentração µg/mL	<i>Streptococcus mitis</i>				
	EB	FH	FAE	FNB	FAQ
1000	CBM	CIM	CBM	CBM	CBM
500	CIM	-	CIM	CIM	CIM
250	-	-	-	-	-
125	-	-	-	-	-
62,5	-	-	-	-	-
31,2	-	-	-	-	-
15,6	-	-	-	-	-
Controle	-	-	-	-	-

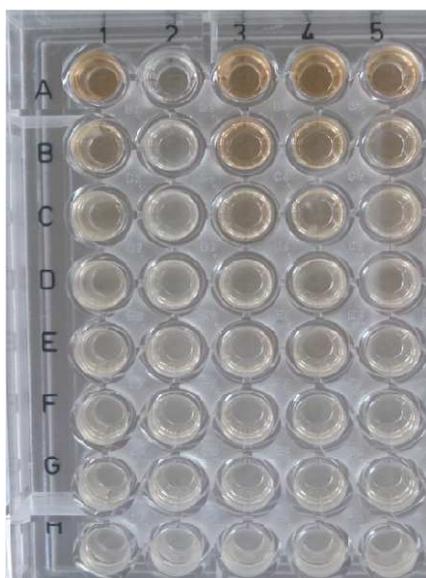


Figura 15: Atividade antimicrobiana do extrato bruto (1), fração hexânica (2), fração acetato de etila (3), fração n-butanólica (4), fração aquosa (5) de *Pyrostegia venusta* contra *Streptococcus mitis* em diferentes concentrações na placa de 96 poços

Tabela 14: CIM e CBM do extrato bruto (EB), fração hexânica (FH), fração acetato de etila (FAE), fração n-butanólica (FB), fração aquosa (FAQ) de *Pyrostegia venusta* contra *Streptococcus oralis* em diferentes concentrações

Concentração µg/mL	<i>Streptococcus oralis</i>				
	EB	FH	FAE	FB	FAQ
1000	CBM	CIM	CBM	CBM	CBM
500	CIM	-	CIM	CIM	CIM
250	-	-	-	-	-
125	-	-	-	-	-
62,5	-	-	-	-	-
31,2	-	-	-	-	-
15,6	-	-	-	-	-
Controle	-	-	-	-	-

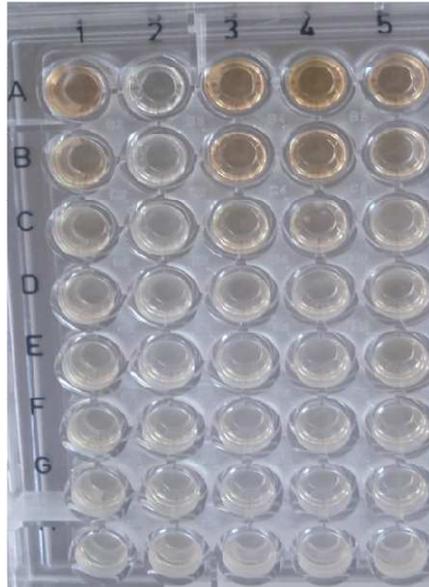


Figura 16: Atividade antimicrobiana do extrato bruto (1), fração hexânica (2), fração acetato de etila (3), fração n-butanólica (4), fração aquosa (5) de *Pyrostegia venusta* contra *Streptococcus oralis* em diferentes concentrações na placa de 96 poços

Tabela 15: CIM e CFM do extrato bruto (EB), fração hexânica (FH), fração acetato de etila (FAE), fração n-butanólica (FB), fração aquosa (FAQ) de *Pyrostegia venusta* contra *Candida albicans* em diferentes concentrações

Concentração µg/mL	<i>Candida albicans</i>				
	EB	FH	FAE	FB	FAQ
1000	CIM	CIM	CIM	CIM	CIM
500	-	-	-	-	-
250	-	-	-	-	-
125	-	-	-	-	-
62,5	-	-	-	-	-
31,2	-	-	-	-	-
15,6	-	-	-	-	-
Controle	-	-	-	-	-

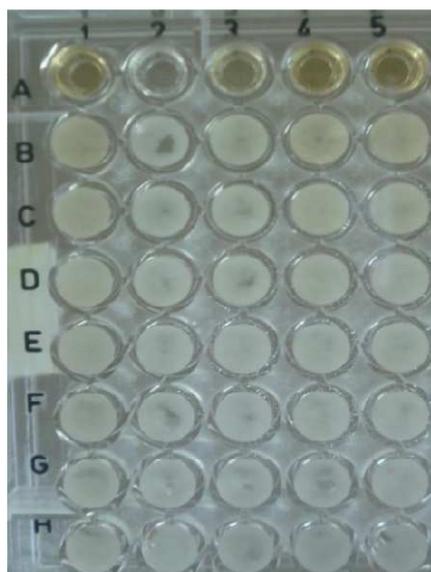


Figura 17: Atividade antimicrobiana do extrato bruto (1), fração hexânica (2), fração acetato de etila (3), fração n-butanólica (4), fração aquosa (5) de *Pyrostegia venusta* contra *Candida albicans* em diferentes concentrações na placa de 96 poços

Tabela 16: CIM dos marcadores acteosídeo (A) e  $\beta$ -OH-verbascosídeo (B) de *Pyrostegia venusta* contra *Streptococcus mutans* em diferentes concentrações

Concentração $\mu\text{g/mL}$	<i>Streptococcus mutans</i>	
	A	B
100	CIM	CIM
50	-	-
25	-	-
12,5	-	-
6,2	-	-
3,1	-	-
1,5	-	-
Controle	-	-

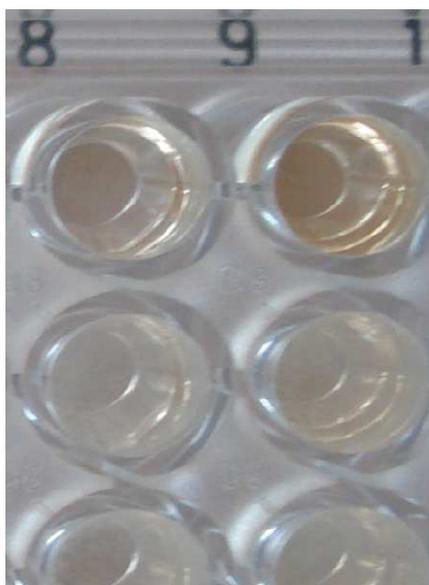


Figura 18: Atividade antimicrobiana dos marcadores acteosídeo (8) e  $\beta$ -OH-verbasosídeo (9) de *Pyrostegia venusta* contra *Streptococcus mutans* em diferentes concentrações na placa de 96 poços

Tabela 17: CIM dos marcadores acteosídeo (A) e  $\beta$ -OH-verbasosídeo (B) de *Pyrostegia venusta* contra *Streptococcus mitis* em diferentes concentrações

Concentração $\mu\text{g/mL}$	<i>Streptococcus mitis</i>	
	A	B
100	CIM	CIM
50	-	-
25	-	-
12,5	-	-
6,2	-	-
3,1	-	-
1,5	-	-
Controle	-	-

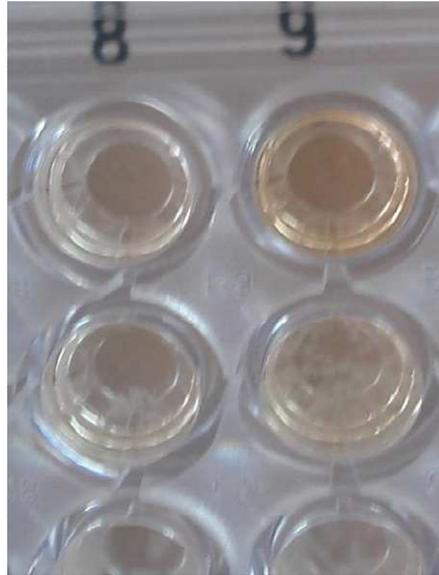


Figura 19: Atividade antimicrobiana dos marcadores acteosídeo (8) e  $\beta$ -OH-verbascosídeo (9) de *Pyrostegia venusta* contra *Streptococcus mitis* em diferentes concentrações na placa de 96 poços

Tabela 18: CIM dos marcadores acteosídeo (A) e  $\beta$ -OH-verbascosídeo (B) de *Pyrostegia venusta* contra *Streptococcus oralis* em diferentes concentrações

Concentração $\mu\text{g/mL}$	<i>Streptococcus oralis</i>	
	A	B
100	CIM	CIM
50	-	-
25	-	-
12,5	-	-
6,2	-	-
3,1	-	-
1,5	-	-
Controle	-	-

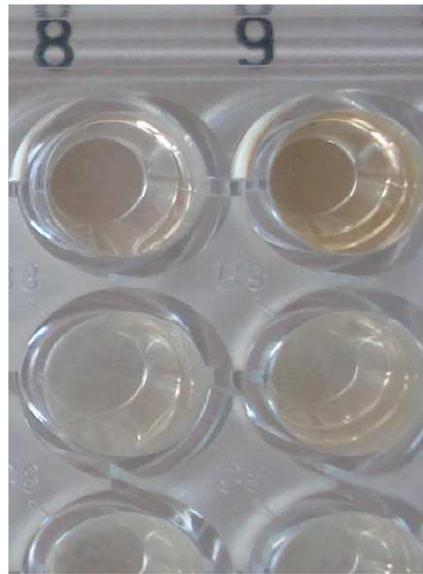


Figura 20: Atividade antimicrobiana dos marcadores acteosídeo (8) e  $\beta$ -OH-verbasosídeo (9) de *Pyrostegia venusta* contra *Streptococcus oralis* em diferentes concentrações na placa de 96 poços

Tabela 19: CIM dos marcadores acteosídeo (A) e  $\beta$ -OH-verbasosídeo (B) de *Pyrostegia venusta* contra *Candida albicans* em diferentes concentrações

Concentração $\mu\text{g/mL}$	<i>Candida albicans</i>	
	A	B
100	CIM	CIM
50	-	-
25	-	-
12,5	-	-
6,2	-	-
3,1	-	-
1,5	-	-
Controle	-	-

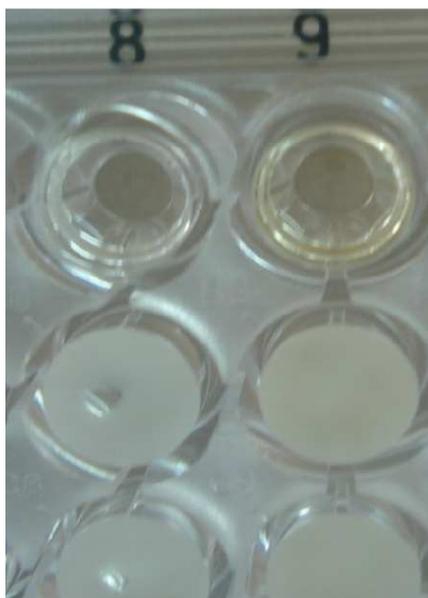


Figura 21: Atividade antimicrobiana dos marcadores acteosídeo (8) e  $\beta$ -OH-verbascosídeo (9) de *Pyrostegia venusta* contra *Candida albicans* em diferentes concentrações na placa de 96 poços

### 5.9.2 TESTE DE ADERÊNCIA EM LAMÍNULA DE VIDRO

O extrato bruto e todas as frações foram capazes de inibir a aderência de *Streptococcus mutans* em superfície de vidro na presença de sacarose em diferentes percentuais. A fração acetato de etila apresentou a maior porcentagem de inibição, com 74,5%, próxima a clorexidina que apresentou 84% de inibição (tabela 20).

Tabela 20: Avaliação da atividade antiaderente do extrato bruto (EB), fração hexânica (FH), fração acetato de etila (FAE), fração n-butanólica (FNB) e fração aquosa (FAQ) de *Pyrostegia venusta* sobre *Streptococcus mutans*

Extrato/Fração	Porcentagem de inibição
EB	65,3 $\pm$ 1,89%
FH	53,3 $\pm$ 1,76%
FAE	74,5 $\pm$ 1,72%
FNB	67 $\pm$ 2,13%
FAQ	61,3 $\pm$ 2,52%
Clorexidina	84 $\pm$ 1,65%

### 5.9.3 EFEITOS DOS EXTRATOS NA PRODUÇÃO DE ÁCIDOS

A queda do pH foi significativamente inibida na presença do extrato bruto, frações hexânica, acetato de etila, n-butanólica, aquosa e da clorexidina mostrando, no início, um pH de 7.1, 7.2, 7.1, 7.1, 7.1, 7.2 e, após 12 horas de incubação, um pH de 6.1, 6.3, 6.3, 6.5, 6.6, 6.8, respectivamente. Por outro lado, o controle negativo (células não tratadas) mostrou um pH de 7.2 no início e, após as 12 horas de incubação, um pH de 5.1 (figura 22).

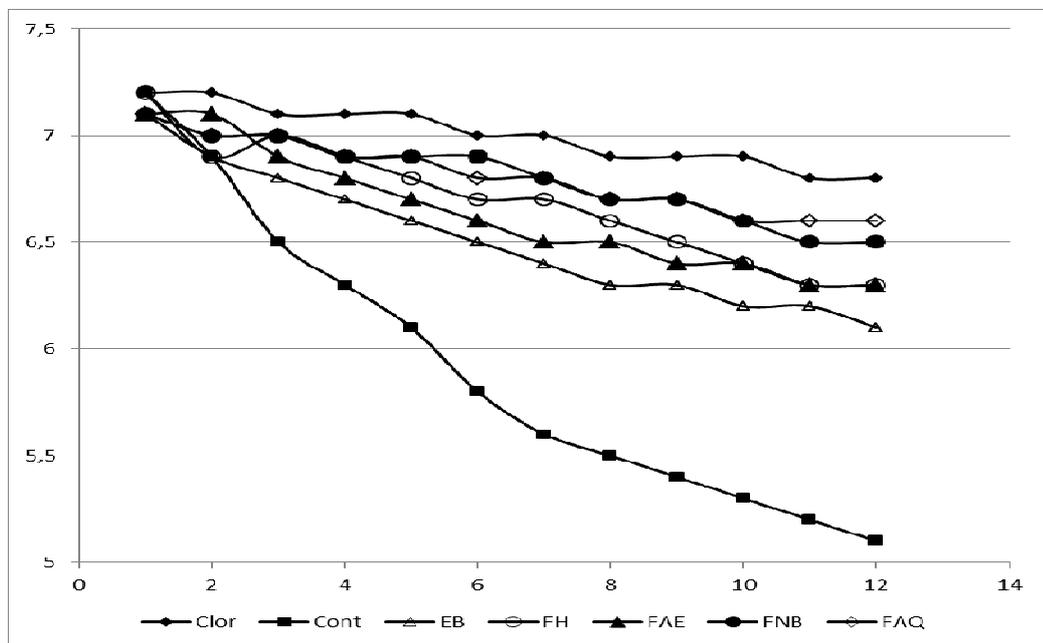


Figura 22: Efeito do extrato bruto (EB), fração hexânica (FH), fração acetato de etila (FAE), fração n-butanólica (FNB) e fração aquosa (FAQ) de *Pyrostegia venusta* na redução da produção de ácidos por *Streptococcus mutans*

### 5.9.4 TESTE DO BROTAMENTO

O brotamento de *Candida albicans* foi inibido pelo extrato bruto e frações hexânica, acetato de etila e n-butanólica, sendo que a fração acetato de etila apresentou a maior porcentagem de células sem brotamento (56,3%). A fração

aquosa não apresentou inibição, pois a sua porcentagem foi comparável ao controle negativo, com apenas 37,6% de células sem brotamento (tabela 21).

Tabela 21: Efeito do extrato bruto (EB), fração hexânica (FH), fração acetato de etila (FAE), fração n-butanólica (FNB) e fração aquosa (FAQ) de *Pyrostegia venusta* no brotamento de *Candida albicans*

Extrato/Frações	Células com brotamento	Células sem brotamento
EB	56,5 ± 0,51%	41,2 ± 3,57%
FH	57,5 ± 0,1%	42,4 ± 0,1%
FAE	43,6 ± 1,55%	56,3 ± 1,55%
FBN	58,2 ± 0,46%	41,6 ± 0,46%
FAQ	62,3 ± 1,64%	37,6 ± 1,64%
Controle negativo	62,3 ± 1,04%	37,6 ± 1,04%

## **6 DISCUSSÃO**

## 6 DISCUSSÃO

A primeira etapa deste trabalho se deteve na realização de metodologias estabelecidas por protocolos de controle de qualidade, que são requisitos mínimos para o cumprimento das Boas Práticas de Fabricação de Produtos Tradicionais Fitoterápicos, de acordo com a legislação vigente no país, a Resolução de Diretoria Colegiada (RDC) nº 13, de 14 de março de 2013, da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) (BRASIL, 2013).

A granulometria de drogas vegetais determina a superfície de contato disponível para interação com o solvente utilizado no processo de extração para a obtenção do derivado vegetal. É um parâmetro preliminar importante para a escolha do processo extrativo e solvente adequado, já que influencia diretamente na eficiência de tal processo (MIGLIATO *et al.*, 2007; NUNES *et al.*, 2009). Segundo a Farmacopeia Brasileira 5ª ed. (2010), na distribuição granulométrica, o pó das flores de *Pyrostegia venusta* foi classificado como pó grosso (Figura 4), fato determinante para a escolha da turbólise como método extrativo, uma vez que o liquidificador de alta rotação é capaz de triturar as partículas do pó, aumentando a superfície de contato entre a droga vegetal e o líquido extrator.

A determinação da perda por dessecação pode oferecer informações importantes com relação ao armazenamento da droga vegetal. A água residual encontrada na droga vegetal seca está diretamente relacionada ao seu correto armazenamento, que pode acarretar na perda do material por contaminação microbiana ou degradação dos constituintes químicos (HUBINGER *et al.*, 2009). O valor da perda por dessecação obtido na análise do pó de *Pyrostegia venusta* foi de 9,46% (Tabela 1). O resultado encontrado está de acordo com as especificações, uma vez que a Farmacopeia Brasileira (2000) preconiza um valor na faixa de 8-14% para drogas vegetais, indicando que o material teve boa conservação e secagem eficiente (SCACHETI *et al.*, 2011).

A determinação do teor de cinzas totais é muito importante para o controle de qualidade, uma vez que o objetivo é verificar a presença de impurezas inorgânicas não voláteis que podem estar contaminando a droga vegetal (FARMACOPEIA BRASILEIRA, 2000; SCACHETI *et al.*, 2011). Na análise do teor de cinzas totais do

pó de *Pyrostegia venusta* o valor encontrado foi de  $9,87 \pm 0,14\%$  (Tabela 1). A pequena variação de porcentagem obtida entre as triplicatas foi utilizada como parâmetro de controle de qualidade deste material vegetal, uma vez que a espécie estudada não possui monografia descrita em farmacopeias.

Na TG o parâmetro a ser medido é a massa, por meio da utilização de uma termobalança que permite medir o ganho ou perda de massa que ocorre na amostra em função de uma variação controlada de temperatura (LUCAS *et al.*, 2001). A DTA é uma derivada da TG, cujas variações de temperatura na amostra são devido às transições entálpicas ou reações endotérmicas ou exotérmicas. As curvas DTA representam os registros de variação de entalpia em função da temperatura (T) ou do tempo (t), de modo que os eventos são apresentados na forma de picos. Os picos ascendentes caracterizam os eventos exotérmicos e os descendentes os endotérmicos (WENDLANDT, 1986; SILVA *et al.*, 2007).

O estudo termogravimétrico do pó das flores de *Pyrostegia venusta* apresentou um comportamento térmico com três etapas de termodecomposição (Figura 6 e Tabela 2). A primeira etapa, entre 30 e 150°C, apresentou uma perda de massa de 9,43%, que pode está relacionada com a perda de umidade e compostos voláteis derivados de fenóis, podendo ser confirmada pela curva endotérmica observada na DTA. Após a desidratação do material, os próximos eventos acima de 150°C, registraram a decomposição dos componentes orgânicos do pó culminando na obtenção de suas cinzas (ARAUJO *et al.* 2006), em uma perda total de 79,92% da massa inicial até 700°C, resultados confirmados com os seus eventos correspondentes na curva DTA. Já o estudo termogravimétrico do extrato bruto liofilizado apresentou um comportamento térmico também com três etapas de termodecomposição (Figura 10 e Tabela 6). A primeira etapa, entre 85 e 170°C, apresentou uma perda de massa de 12,812%, podendo ser confirmada pela curva endotérmica observada na DTA. Após a desidratação do material, os próximos eventos acima de 170°C, registraram a decomposição dos componentes orgânicos do pó culminando na obtenção de suas cinzas (ARAUJO *et al.* 2006), em uma perda total de 71,912% da massa inicial até 700°C, resultados confirmados com os seus eventos correspondentes na curva DTA.

A DSC foi desenvolvida com o intuito de evitar as dificuldades encontradas na DTA ou compensá-las, criando um equipamento capaz de quantificar a energia envolvida nas reações de entalpia. Os processos comumente estudados por DSC

são os que envolvem troca de calor como transição vítrea (troca de linha de base), cristalização (transição exotérmica) e fusão (transição endotérmica) (RODRIGUES e MARCHETTO, 2002). Na análise do pó de *Pyrostegia venusta*, observa-se que a decomposição do material ocorre em reações sucessivas a julgar pelos dois picos exotérmicos com intensidade de 4,87 e 6,98kJ/g (Figura 7 e Tabela 3). Já no extrato bruto liofilizado, observa-se um único pico exotérmico com a entalpia 1,13 kJ/g (Figura 11 e Tabela 7).

A espectroscopia na região do IV é uma técnica amplamente utilizada de análise de substâncias sólidas (BUGAY, 2001). Em determinadas situações diz respeito aos movimentos de torção, deformação, rotação e vibração dos átomos de uma molécula. Quando a radiação infravermelha incide sobre uma molécula, parte dela é absorvida, originando uma multiplicidade de vibrações que ocorrem simultaneamente, fornecendo um complexo espectro de absorção, que é característico dos grupos funcionais e da configuração geral do átomo presente na molécula (SILVERSTEIN, 1981; SILVA JÚNIOR *et al.*, 2006). Nos espectros na região IV do extrato bruto liofilizado e do pó (Figura 8, Tabela 4, Figura 12, Tabela 8) foi possível identificar uma forte absorção na região entre 3200 – 3500  $\text{cm}^{-1}$  no espectro referente ao extrato, tal intensificação de absorção da banda em torno de 3238  $\text{cm}^{-1}$  é sugestiva de grupos hidroxila (–OH), que pode estar relacionada ao processo de extração dos constituintes químicos da matriz celular. A absorção em 2926  $\text{cm}^{-1}$  corresponde aos modos de deformação axial de C-H, podendo ser axial assimétrica ou axial simétrica (SILVERSTEIN *et al.*, 2006). As intensas absorções nas regiões entre 1200 e 1600  $\text{cm}^{-1}$ , são sugestivas de um grande número de grupamentos funcionais característicos de metabólitos secundários devido à intensidade das bandas nessa região do espectro (SILVA JÚNIOR *et al.*, 2006).

Após a caracterização físico-química da droga seca pulverizada, foram obtidas diferentes tinturas do pó de *Pyrostegia venusta* com diferentes concentrações de líquido extrator: etanol puro e mistura hidroetanólica 70% (v/v), 50% (v/v) e 30% (v/v). O extrato obtido com a mistura hidroetanólica 30% (v/v) apresentou melhor atividade antimicrobiana quando comparado aos demais no teste de microdiluição em caldo e, portanto, foi eleita como líquido extrator. A relação entre as diferentes concentrações de etanol e a diferença de atividade antimicrobiana pode estar relacionada à polaridade dos metabólitos secundários responsáveis por esta atividade que, provavelmente, está mais próxima da água.

A densidade da tintura de *Pyrostegia venusta* foi de 0,89 g/mL (Tabela 5), dentro da faixa que varia de 0,87 a 0,98 g/mL, correspondente à densidade das tinturas a temperatura de 15 a 20°C pelo método do picnômetro (PRISTA *et al.*, 1990; NUNES *et al.*, 2009). O pH da tintura de *Pyrostegia venusta* (Tabela 5), sugeriu a presença de substâncias ácidas (MIGLIATO *et al.*, 2007; SCACHETI *et al.*, 2011).

A determinação do teor de sólidos é um parâmetro fundamental e preliminar quando se objetiva alcançar a eficácia de uma formulação fitoterápica, pois este ensaio implica na quantificação das substâncias extraídas da planta através da eliminação do líquido extrator, sendo assim, esse percentual é um indicativo da concentração da tintura (OLIVEIRA e BERRETTA, 2007; NUNES *et al.*, 2009). O percentual de resíduo seco da tintura de *Pyrostegia venusta* foi de 4,5% (Tabela 5).

A tintura foi levada a um evaporador rotativo para eliminar todo o solvente e, em seguida, o extrato seco obtido foi liofilizado com a intenção de se manter uma melhor estabilidade do material, conservando-se composição química e atividade terapêutica (AYROSA, 2004; AYROSA *et al.*, 2007).

Para a obtenção das frações de *Pyrostegia venusta* foram selecionados os solventes de baixa, média e alta polaridade como o hexano, acetato de etila e álcool n-butílico, respectivamente, para avaliar de maneira mais específica o comportamento das mesmas frente aos microrganismos selecionados, levando-se em consideração que as substâncias responsáveis pela atividade biológica poderiam estar presentes nas frações por semelhança de solubilidade (OTOBELLI, 2009).

A prospecção química, segundo metodologia proposta por Barbosa (2001), foi realizada para investigar qualitativamente os principais grupos de metabólitos secundários presentes no extrato bruto da espécie vegetal em estudo. A prospecção química do extrato bruto de *Pyrostegia venusta* apresentou resultado positivo para saponinas, fenóis e taninos, proteínas e aminoácidos, e azulenos (Tabela 9).

Em relação às análises de atividades biológicas de produtos naturais, um dos principais problemas é a falta de determinação da toxicidade celular, o que contribui para aumentar a incidência de resultados falso-positivos, ou seja, extratos equivocadamente classificados como promissores. Tal problema pode ser resolvido pela inclusão de um ensaio de citotoxicidade sobre linhagens de células hospedeiras (COS *et al.*, 2006). No ensaio de citotoxicidade realizado com macrófagos murinos, o extrato bruto e frações não foram citotóxicos na concentração de até 100 µg/mL.

Já no teste realizado com células mononucleares de sangue periférico, o extrato bruto e frações foram citotóxicos na concentração de 1000 µg/mL (Tabela 10 e Tabela 11). Portanto, em baixas concentrações, o extrato bruto/frações de *P. venusta* podem ser promissores. Ainda sobre citotoxicidade, Almeida e colaboradores (2007) demonstraram que o ensaio de citotoxicidade com o uso de *Trypan Blue* pode apresentar um número maior de células não viáveis quando comparado com o ensaio com MTT.

Bactérias periodontopatogênicas e citocinas inflamatórias podem induzir uma maior síntese de NO por macrófagos nos tecidos periodontais. A consequência local da alta produção de NO não apenas está envolvida com os mecanismos de defesa do hospedeiro, mas também contribui para o dano tecidual, causando destruição dos tecidos de sustentação do dente (LOHINAI *et al.*, 1998; LIMA *et al.*, 2008). Neste estudo, as frações acetato de etila e n-butanólica de *Pyrostegia venusta* foram capazes de inibir a produção de NO em macrófagos estimulados com LPS na concentração de 100 µg/mL, sendo promissoras na pesquisa de novos agentes cujo alvo é o bloqueio da resposta do hospedeiro, além do controle das bactérias patogênicas, representando um conceito emergente no tratamento da periodontite (OWER *et al.*, 1995; LIMA *et al.*, 2008).

A avaliação da atividade antimicrobiana do extrato bruto, frações e marcadores da espécie vegetal em estudo foi realizada através do teste de microdiluição em caldo para determinar a CIM em alguns microrganismos presentes no biofilme dental.

Aligiannis e colaboradores (2001) propuseram uma classificação para a atividade antimicrobiana de extratos vegetais de acordo com a CIM sendo considerados: fortes inibidores (CIM até 0,5 mg/mL); inibidores moderados (CIM entre 0,6 e 1,5 mg/mL); e inibidores fracos (CIM a partir de 1,6 mg/mL). Em outro estudo, Holetz e colaboradores (2002) propuseram outra classificação também de acordo com a CIM: se o extrato apresentar CIM menor do que 100 µg/mL, a atividade é considerada boa; se apresentar CIM entre 101 e 500 µg/mL, a atividade é considerada moderada; se apresentar CIM entre 501 até 1000 µg/mL, a atividade é considerada fraca; e se apresentar CIM maior do que 1000 µg/mL, o extrato é considerado inativo.

De acordo com a classificação de Aligiannis e colaboradores (2001), o extrato bruto e frações de *Pyrostegia venusta* são considerados de moderados a fortes

inibidores microbianos. O extrato bruto apresentou CIM de 500 µg/mL em todas as bactérias, já em *C. albicans* a CIM foi 1000 µg/mL, sendo considerado como forte e moderado inibidor, respectivamente. A fração hexânica apresentou CIM de 1000 µg/mL para todos os microrganismos testados, portanto, é considerada como um inibidor moderado. A fração acetato de etila teve CIM de 500 µg/mL em todas as bactérias e 1000 µg/mL em *C. albicans*, sendo considerada como um forte e moderado inibidor, respectivamente. A fração n-butanólica teve CIM de 500 µg/mL nas bactérias e de 1000 µg/mL na levedura, sendo considerada como um forte e moderado inibidor, respectivamente. E a fração aquosa apresentou CIM de 500 µg/mL em *S. mitis* e *S. oralis*, e CIM de 1000 µg/mL em *S. mutans* e *C. albicans*, sendo considerada como um forte e moderado inibidor, respectivamente.

Por outro lado, de acordo com a classificação proposta por Holetz e colaboradores (2002), o extrato bruto e frações de *Pyrostegia venusta* apresentaram atividade antimicrobiana de fraca a moderada em relação aos microrganismos testados neste estudo. O extrato bruto apresentou CIM de 500 µg/mL em todas as bactérias, já em *C. albicans* a CIM foi 1000 µg/mL, sendo considerado como tendo atividade moderada e fraca, respectivamente. A fração hexânica apresentou CIM de 1000 µg/mL para todos os microrganismos testados, portanto, é considerada como tendo fraca atividade. A fração acetato de etila teve CIM de 500 µg/mL em todas as bactérias e 1000 µg/mL em *C. albicans*, sendo considerada como tendo atividade moderada e fraca, respectivamente. A fração n-butanólica teve CIM de 500 µg/mL nas bactérias e de 1000 µg/mL na levedura, sendo considerada como tendo atividade moderada e fraca, respectivamente. Já a fração aquosa apresentou CIM de 500 µg/mL em *S. mitis* e *S. oralis*, e CIM de 1000 µg/mL em *S. mutans* e *C. albicans*, sendo considerada como tendo atividade moderada e fraca, respectivamente.

Duarte e colaboradores (2005) determinaram que todos os extratos cuja CIM fosse de até, no máximo, 2mg/mL eram considerados com potencial antimicrobiano. Sendo assim, a espécie *Pyrostegia venusta* possui atividade antimicrobiana frente a todos os microrganismos testados.

Os resultados obtidos da avaliação da atividade antimicrobiana de *P. venusta* neste estudo coincidem com os resultados de SILVA e colaboradores (2011) e ROY e colaboradores (2012), que observaram atividade moderada do extrato metanólico

e hexânico das flores e folhas de *Pyrostegia venusta*, respectivamente, contra bactérias Gram positivas e Gram negativas e fungos.

O verbascosídeo pode ser muitas vezes encontrado na literatura pelo sinônimo acteosídeo e é um composto largamente encontrado nos vegetais que apresentam atividade antibacteriana e antifúngica (BRAGA *et al.*, 2009). Neste estudo, a atividade antimicrobiana do extrato/frações de *Pyrostegia venusta* pode estar relacionada com a presença dos marcadores acteosídeo e  $\beta$ -OH-verbascosídeo isolados desta espécie.

Ambos os marcadores apresentaram atividade antimicrobiana em todos os microrganismos testados, sendo que a CIM foi de 100  $\mu$ g/mL. Estes resultados corroboram com Pereira e colaboradores (2008) que isolaram acteosídeo da espécie *Lantana lilacina* e observaram atividade antimicrobiana desta substância contra algumas bactérias. Porém a concentração inibitória mínima e a concentração bactericida mínima desta substância para *A. hydrophila*, *B. subtilis*, *P. aeruginosa* e *S. aureus* foram de 0,12, 1,00, 1,00 e 0,25 mg/mL, respectivamente, valores acima dos obtidos neste estudo.

Vandresen e colaboradores (2010) isolaram verbascosídeo da espécie *Aloysia gratissima* e comprovaram atividade antimicrobiana contra *S. aureus* e *M. luteus*. A CIM variou de 500-250  $\mu$ g/mL para *S. aureus* e 1000-500  $\mu$ g/mL para *M. luteus*. Didry e colaboradores (1999) também observaram atividade antibacteriana de verbascosídeo frente aos microrganismos *S. aureus* e *P. mirabilis* com CIM igual a 128  $\mu$ g/mL. Ambos os estudos apresentaram CIM acima dos valores obtidos neste estudo. Em contrapartida, Souza e colaboradores (2010b) isolaram o marcador verbascosídeo da espécie *Stachytarpheta cayennensis* e observaram que este apresentou atividade antimicrobiana com CIM de 62  $\mu$ g/mL, 32  $\mu$ g/mL e 63  $\mu$ g/mL contra *S. pyogenes*, *S. epidermidis* e *S. aureus*, respectivamente. Dessa forma, a CIM encontrou-se abaixo dos valores obtidos neste estudo.

A prevenção da cárie depende do controle do biofilme dental microbiano. Sendo assim, as pesquisas objetivam encontrar agentes que tem ação direta sobre os microrganismos cariogênicos ou que possam interferir nos fatores envolvidos na formação do biofilme (OWER *et al.*, 1995; MARSH, 2003). O resultado do teste de aderência (Tabela 20) mostra que todos os extratos de *Pyrostegia venusta* foram capazes de inibir a aderência de *S. mutans* em superfície lisa na presença de sacarose, sendo que a fração acetato de etila apresentou o melhor percentual

(74,5%). O extrato bruto inibiu 65,3%, a fração hexânica inibiu 53,3%, a fração n-butanólica inibiu 67% e a fração aquosa 61,3%. Sasaki e colaboradores (2007) utilizaram o mesmo modelo experimental utilizado neste estudo com os extratos de *Paullinia cupana* (guaraná) e obtiveram resultados semelhantes.

A produção de ácidos a partir da fermentação de carboidratos pelas bactérias pode levar a uma queda do pH da placa ocasionando a desmineralização dos dentes e a formação de uma lesão de cárie. Condições de baixo pH, por sua vez, favorecem a proliferação de espécies acidúricas e acidogênicas, especialmente o *S. mutans* e os lactobacilos. Dessa forma, uma das estratégias de prevenção da cárie seria a utilização de um agente capaz de inibir a produção de ácidos na placa (THYLSTRUP e FEJERSKOV, OWER *et al.*, 1995; MARSH, 2003; KERESKI, 2012). Os extratos de *Pyrostegia venusta* foram eficazes na redução da produção de ácidos por *S. mutans* com um efeito comparável ao da clorexidina (Figura 22). A queda do pH foi significativamente inibida na presença do extrato bruto, frações hexânica, acetato de etila, n-butanólica, aquosa e da clorexidina mostrando, no início, um pH de 7.1, 7.2, 7.1, 7.1, 7.1, 7.2 e, após 12 horas de incubação, um pH de 6.1, 6.3, 6.3, 6.5, 6.6, 6.8, respectivamente. Por outro lado, o controle negativo (células não tratadas) mostrou um pH de 7.2 no início e, após as 12 horas de incubação, um pH de 5.1.

A formação de hifas ou filamentos é um dos fatores de virulência de *Candida albicans*, capacitando-a para exercer uma força mecânica que contribui para a sua penetração nos tecidos humanos, inclusive nos tecidos orais. Apesar de ser uma levedura saprófita, pode comportar-se como um patógeno oportunista em algumas situações (CALDERONE e FONZI, 2001; KUMAMOTO, 2005; ISHIDA *et al.*, 2006). O extrato bruto e frações de *Pyrostegia venusta* foram capazes de inibir a formação de brotos em *Candida albicans*, sendo que a fração acetato de etila apresentou a maior porcentagem (56,3%) e a fração aquosa apresentou a menor porcentagem (37,6) de inibição de células com brotamento (Tabela 21).

## **7 CONCLUSÕES**

## 7 CONCLUSÕES

Através das análises físico-químicas farmacopeicas e não farmacopeicas do pó, da tintura e do extrato bruto liofilizado da espécie *Pyrostegia venusta* foi possível obter parâmetros de controle de qualidade importantes e indispensáveis para o cumprimento das Boas Práticas de Fabricação de Produtos Tradicionais Fitoterápicos. Além disso, servem de referência para futuros estudos que possam ser desenvolvidos com esta mesma espécie vegetal.

A avaliação da citotoxicidade do extrato bruto e frações de *Pyrostegia venusta* permitiu concluir que esta espécie pode ser promissora em baixas concentrações, porém em altas concentrações pode ser citotóxica.

A avaliação da atividade antimicrobiana e imunomoduladora do extrato bruto, frações e marcadores de *Pyrostegia venusta* permitiu concluir que a espécie em questão possui um potencial biológico importante na prevenção e tratamento de doenças bucais (cárie, doença periodontal e candidíase oral), atuando não somente de forma direta sobre os microrganismos do biofilme e fatores de virulência, mas, também, nos fatores ambientais que estão relacionados com a seleção dos mesmos como o pH e a inflamação.

Mais estudos são necessários, incluindo modelos experimentais *in vivo* e aplicabilidade farmacológica, antes de se considerar o extrato/frações de *Pyrostegia venusta* realmente promissores.

## **8 REFERÊNCIAS**

## 8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABE, F.; NAGAO, T.; OKABE, H. **Antiproliferative constituents in plants. Aerial parts of *Lippia dulcis* and *Lippia canescens*.** Biol. Pharm. Bull., v. 25, n. 7, p. 920–922, 2002.
- ALBUQUERQUE, A. C. L. *et al.* **Efeito antimicrobiano do extrato da *Matricaria recutita* Linn. e *Lippia sidoides* Cham. sobre microrganismos do biofilme dental.** Revista de Biologia e Farmácia, v. 4, n. 1, p. 11-19, 2010a.
- ALBUQUERQUE, A. C. L. *et al.* **Efeito antiaderente do extrato da *Matricaria recutita* Linn. sobre microrganismos do biofilme dental.** Rev Odontol UNESP, v. 39, n. 1, p. 21-25, 2010b.
- ALIGIANNIS, N.; KALPOTZAKIS, E.; MITAKU, S.; CHINOU, I. B. **Composition and antimicrobial activity of the essential oils of two *Origanum* species.** Journal of Agricultural and Food Chemistry, n. 40, p. 4168–4170, 2001.
- ALMEIDA, M. V.; TEIXEIRA, F. M.; DE SOUZA, M. V.; AMARANTE, G. W.; ALVES, C. C.; CARDOSO, S. H.; MATTOS, A. M.; FERREIRA, A. P.; TEIXEIRA, H. C. **Thalidomide analogs from diamines: Synthesis and evaluation as inhibitors of TNF-alpha production.** Chem. Pharm. Bull. (Tokyo), v. 55, n. 2, p. 223–226, 2007.
- ALVES, P. M. *et al.* **Atividade antimicrobiana, antiaderente e antifúngica *in vitro* de plantas medicinais brasileiras sobre microrganismos do biofilme dental e cepas do gênero *Candida*.** Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical, v. 42, n. 2, p. 222-224, mar-abr, 2009.
- ALVES, T. M. S. *et al.* **Atividade Antimicrobiana de Produtos Fluoretados sobre Bactérias Formadoras do Biofilme Dentário: Estudo *in vitro*.** Pesq Bras Odontoped Clin Integr, João Pessoa, v. 10, n. 2, p. 209-216, maio/ago. 2010.
- ANTONIETTA, R. *et al.* **Effect of resveratrol and modulation of cytokine production on human periodontal ligament cells.** Cytokine, n. 60, p. 197–204, 2012.
- ARAÚJO, A. A.; S. MERCURI, L. P.; SEIXAS, S. R. S.; STORPITIS, S.; MATOS, J. R. **Determinação dos teores de umidade e cinzas de amostras comerciais de guaraná utilizando métodos convencionais e análise térmica.** Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences, v. 42, n.2, abr/jun., 2006.
- ARMITAGE, G. C. **Periodontal diagnoses and classification of periodontal diseases.** Periodontology 2000, v. 34, p. 9-12, 2004.
- ASSUMA, R.; OATES, T.; COCHRAN, D.; AMAR, S.; GRAVES, D. T. **IL-1 and TNF antagonists inhibit the inflammatory response and bone loss in experimental periodontitis.** J Immunol., n. 160, p. 403-9, 1998.

AYROSA, A. M. I. B. **Liofilização: ciência ou arte?** Revista de Engenharia da FAAP, São Paulo, v. 44-40, 2004.

AYROSA, A. M. I. B.; MAIZATO, M. J.; POLAKIEWICZ, B.; BEPPU, M. M.; PITOMBO, R. N. M. **Estudo do comportamento higroscópico do pericárdio bovino liofilizado.** Revista Matéria (UFRJ), v. 12. p. 313-321. Rio de Janeiro, 2007.

BARA, M. T. F. *et al.* **Caracterização Físico-Química do Pó das Folhas de *Eugenia Dysenterica* Dc. (Myrtaceae).** Revista Eletrônica de Farmácia, v. 6, n. 3, p. 59-69, 2009.

BARBIERI, D. S. V. **Análise da aderência “in vitro” de *Streptococcus mutans* e *Candida albicans* na superfície dentária.** 2005. Dissertação (Mestrado em Microbiologia). Curso de Pós-Graduação em Microbiologia, Parasitologia e Patologia. Universidade Federal do Paraná. Curitiba, 2005.

BARBOSA, W. L. R. **Manual para Análise Fitoquímica e Cromatográfica de Extratos Vegetais,** Belém – Pa: Revista Científica da UFPA, 2001. Disponível em <http://www.ufpa.br/cientifica>. v. 4, 2004. Acesso em 13 de outubro de 2011.

BAUER, A. W. *et al.* **Antibiotic susceptibilities testing by standard single disc diffusion method.** American Journal of Clinical Pathology, v. 45, p. 493-496, 1966.

BENSO, B. **Estudo do efeito da *Malva sylvestris* em fibroblastos estimulados com LPS.** 68 f., 2012. Dissertação (Mestrado em Clínica Integrada). Programa de Pós-graduação em Odontologia. Universidade Estadual de Ponta Grossa. Ponta Grossa, 2012.

BOTELHO, M. A. *et al.* ***Lippia sidoides* and *Myracrodruon urundeuva* gel prevents alveolar bone resorption in experimental periodontitis in rats.** Journal of Ethnopharmacology, n. 113, p. 471–478, 2007.

BOWDEN, G. H.; HARDIE, J. M.; MCKEE, A. S.; MARSH, P. D.; FILLERY, E. D.; SLACK, G. L. **The microflora associated with developing carious lesions of the distal surfaces of the upper first molars in 13-14 year old children.** Microbial aspects of dental caries, p. 233-241, 1976. Washington , DC: information retrieval.

BRAGA, J. M. F.; PIMENTEL, R. M. M.; FERREIRA, C. P.; RANDAU, K. P.; XAVIER, H. S. **Morfoanatomia, histoquímica e perfil fitoquímico de *Priva lappulacea* (L.) Pers. (Verbenaceae).** Revista Brasileira de Farmacognosia, v. 19, n. 2B, p. 516-523, Abr./Jun. 2009.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária - ANVISA. **Resolução Diretora Colegiada nº 13, de 14 de março de 2013. Dispõe sobre o registro de medicamentos fitoterápicos.** D.O.U. - Diário Oficial da União; Poder Executivo, 14 de março de 2013, Brasília, 2013.

BUGAY, D. E. **Characterization of the solid-state: spectroscopic techniques.** Adv. Drug Delivery Rev, v. 48, p. 43-65, 2001.

CALDERONE RA, FONZI WA. **Virulence factors of *Candida albicans***. Trends Microbiol, v. 9; p. 327–35, 2001.

CAMPISI G, PIZZO G, MILICI ME. **Candidal carriage in the oral cavity of human immunodeficiency virus- infected subjects**. Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod. v. 93, p. 281-6, 2002.

CARVALHO, R. S. M. **Investigação da atividade farmacológica central dos extratos aquoso e hidroalcoólico, da fração butanólica e do verbascosídeo de *Lippia alba* (MILLER) N. E. Brown (falsa melissa) – Verbenaceae**. Florianópolis, 2006, 96 p. Dissertação (Mestrado em Farmacologia) – Curso de Pós-Graduação em Farmacologia, Universidade Federal de Santa Catarina.

CARVALHO, A.C.B.; NUNES, D.S.G.; BARATELLI, T.G.; SHUQAIR, NS. M.S.A.Q.; NETTO, E.M. **Aspectos da legislação no controle dos medicamentos fitoterápicos**. T&C Amazônia, Ano. V, n. 11, Jun. 2007.

CLSI. **Padronização dos testes de sensibilidade a antimicrobianos por disco difusão: Norma aprovada - Oitava edição**. M2-A8, v. 23, n. 1, 2003a.

CLSI. **Metodologia dos testes de sensibilidade a agentes antimicrobianos por diluição para bactéria de crescimento aeróbico: Norma aprovada- Sexta edição**. M7-A6, v. 23, n. 2, 2003b.

CORDEIRO, C. H. G.; SACRAMENTO, L. V. S.; CORRÊA, M. A.; PIZZOLITTO, A. C.; BAUAB, T. M. **Análise farmacognóstica e atividade antibacteriana de extratos vegetais empregados em formulação para a higiene bucal**. Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas, v. 42, n. 3, jul./set., p. 395-404, 2006.

COS, P.; VLIETINCK, A. J.; BERGHE, D. V.; MAES, L. **Anti-infective potential of natural products: how to develop a stronger in vitro 'proof-of-concept'**. Journal of Ethnopharmacology, v. 106, n.3, p. 290-302. 2006.

COSTA, A. C. B. P. *et al.* **Atividade antifúngica dos extratos glicólicos de *Rosmarinus officinalis* Linn. e *Syzygium cumini* Linn. sobre cepas clínicas de *Candida albicans*, *Candida glabrata* e *Candida tropicalis***. Revista de Odontologia da UNESP, v. 38, n. 2, p. 111-116, 2009.

COSTERTON, J. W. *et al.* **Bacterial biofilms: a common cause of persistent infections**, Science, v. 284, p. 1318-1322, 1999.

CUNHA, A. P. **Farmacognosia e Fitoquímica**. Fundação Calouste Gulbenkian: Lisboa, p. 317-336, 2005.

DAHAKI, A. P. *et al.* **Antimicrobial screening of different extract of *Anacardium occidentale* Linn. leaves**. International Journal of ChemTech Research, v. 1, n. 4, p. 856-858, 2009.

DIDRY N.; SEIDEL, V.; DUBREUIL, L.; TILLEQUIN, F.; BAILLEUL, F. **Isolation and antibacterial activity of phenylpropanoid derivatives from *Ballota nigra***. J Ethnopharmacol., v. 67, p. 197-202, 1999.

DITTERICH, R.G. *et al.* **Atividade antimicrobiana “in vitro” de substâncias naturais presentes nos dentifrícios**. Odontologia. Clín.-Cientif., Recife, n. 6, v. 4, p. 303-307, out/dez., 2007.

DUARTE, M. *et al.* **Anti-Candida activity of Brazilian medicinal plants**. Journal of Ethnopharmacology, n. 97, p. 305–311, 2005.

DUARTE, M. R.; JURGENSEN, I. **Diagnose Morfoanatômica de Folha e Caule de *Pyrostegia venusta* (Ker Gawl.) Miers, Bignoniaceae**. Lat. Am. J. Pharm., v. 26, n. 1, p. 70-5, 2007.

DUBEY, R. C.; MISRA, K. **Chemical components of *Pyrostegia venusta* flowers**. Journal of Indian Chemical Society, v. 53, p. 378–381, 1976.

FAEGRI, K.; VAN DER PIJL, L. **The Principles of Pollination Ecology**, Pergamon Press Ltd., Headington Hill Hall, Oxford, England, 3<sup>o</sup> Revised Edition, 244 p., 1980.

FARMACOPEIA BRASILEIRA. 4a ed. São Paulo: Atheneu; 2000

FARMACOPÉIA BRASILEIRA, 5<sup>a</sup> ed. São Paulo: FIOCRUZ, 2010.

FERREIRA, D. T.; ALVAREZ, P. S. M.; HOUGHTON, P. J., BRAZ-FILLHO, R. **Chemical constituents from roots of *Pyrostegia venusta* and considerations about its medicinal importance**, Quimica Nova, v. 23, p. 42–46, 2000.

FONTANA, M; YOUNG, D. A.; WOLFF, M. S.; PITTS, N. B.; LONGBOTTOM, C. **Defining dental caries for 2010 and beyond**. Dent Clin N Am, n. 54, p. 423–440, 2010.

FRANCISCO, K. S. F. **Fitoterapia: Uma opção para o tratamento odontológico**. Revista Saúde, v. 4, n. 1, p. 18-24, 2010.

FRUM, Y.; VILJOEN, A. M.; VAN HEERDEN, F. R. **Verbascoside and luteolin-5-O- $\beta$ -D-glucoside isolated from *Halleria lucida* L. exhibit antagonistic anti-oxidant properties in vitro**. South African Journal of Botany, v. 73, p. 583–587, 2007.

GENTRY, A. H. **Bignoniaceae: I (*Crescentieae* and *Tourrettieae*)**. Flora Neotropica Monograph, n. 25, p.1-130, 1980.

GOBATTO-RODRIGUES, A.A. & STORT, M.N.S. 1992. **Biologia floral e reprodução de *Pyrostegia venusta* (Ker-Gawl) Miers (Bignoniaceae)**. Revista Brasileira de Botânica 15:37-41.

GOTHANDAM, K. M.; AISHWARYA, R.; KARTHIKEYAN, S. **Preliminary screening of antimicrobial properties of few medicinal plants**. Journal of Phytology, v. 2, n. 4, p. 01–06, 2010.

GOTTLIEB, O. R.; MORS, W.B. J. Agric. Food. Chem. 1980. 28. 196.

GUPTA, M. B.; NATH, R.; SRIVASTAVA, N.; SHANKER, K.; KISHOR, K.; BHARGAVA, K. P. **Anti-inflammatory and antipyretic activities of beta-sitosterol**. *Planta Med*, 39, 157-163, 1980.

HALBERSTEIN, R. A. **Medicinal plants: Historical and Cross-Cultural Usage Patterns**. *Ann Epidemiol*, v. 15, n. 9, p. 686-699, 2005.

HAMADA, S.; TORII, M.; KOTANI, S.; TSUCHITANI, Y. **Adherence of *Streptococcus sanguis* clinical isolates to smooth surfaces and interaction of the isolates with *Streptococcus mutans* glucosyltransferase**. *Infect. Immun.*, n. 32, p. 364-372, 1981.

HAROKOPAKIS, E.; ALBZREH, M. H.; HAASE, E. M.; SCANNAPIECO, F. A.; HAJISHENGALLIS, G. **Inhibition of proinflammatory activities of major periodontal pathogens by aqueous extracts from elder flower (*Sambucus nigra*)**. *J Periodontol*, n. 77, p. 271-279, 2006.

HERBERT, J.M.; MAFFREND, J.P.; TAOUBI, K.; AUGEREAU, J.M.; FOURASTE, I.; GLEYE, J. **Verbascoside isolated from *Lantana camara*, an inhibitor of protein kinase C**. *J. Nat. Prod.*, v.54, n.6, p.1595 – 1600, 1991.

HOLETZ, F. B.; PESSINI, G. L.; SANCHES, N. R.; CORTEZ, D. A. G.; NAKAMURA, C. V.; DIAS FILHO, B. P. **Screening of Some Plants Used in the Brazilian Folk Medicine for the Treatment of Infectious Diseases**, *Mem Inst Oswaldo Cruz*, Rio de Janeiro, v. 97, n. 7, p. 1027-1031, October 2002.

HUBINGER, S. Z. *et al.* **Controles físico, físico-químico, químico e microbiológico dos frutos de *Dimorphandra mollis* Benth., Fabaceae**, *Revista Brasileira de Farmacognosia*, v. 19, n. 3, p. 690-696, Jul./Set. 2009.

ISHIDA, K.; MELLO, J. C. P.; CORTEZ, D. A. G.; DIAS FILHO, B. P.; UEDA-NAKAMURA, T.; NAKAMURA, C. V. **Influence of tannins from *Strypnodendron adstringens* on growth and virulence factors of *Candida albicans***. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, v. 58, p. 942–949, 2006.

JIA, Z.J.; LIU, Z.M.; WANG, C.Z. **Phenylpropanoid and iridoid glycosides from *Pedicularis lasiophrys***. *Phytochemistry*, v.31, n.1, p.263 – 6, 1992.

JOVITO, V. C. **Avaliação clínica e microbiológica de um dentifrício contendo extrato hidroalcoólico da *Eugenia uniflora* L. (pitangueira) sobre microrganismos cariogênicos**. 2009. 65 f. Trabalho de Conclusão do Curso de Odontologia. Universidade Federal da Paraíba. João Pessoa, 2009.

JU YH, CLAUSEN LM, ALLRED KF, ALMADA AL, HELFERICH WG (2004). **Beta-sitosterol, beta-sitosterol glucoside and a mixture of beta-sitosterol and beta-sitosterol glucoside modulate the growth of estrogen-responsive breast cancer cells in vitro and in ovariectomized athymic mice**. *J. Nutr.*, 134: 1145-1151.

KERESKI, A. S. **Prevenção e tratamento das lesões cariosas associadas ao tratamento ortodôntico**. 2012. 36f. TCC (Graduação em Odontologia). Faculdade de Odontologia. Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Porto Alegre, 2012.

KINANE, D. F. **Causation and pathogenesis of periodontal disease**. *Periodontology* 2000, v. 25, p. 8-20, 2001.

KOO, K. A.; SUNG, S. H.; PARK, J. H.; KIM, S. H.; LEE, K. Y.; KIM, Y. C. **In vitro neuroprotective activities of phenylethanoid glycosides from *Callicarpa dichotoma***. *Planta Med*, n. 71, p. 778-780, 2005

KUMAMOTO, C. **A contact-activated kinase signals *Candida albicans* invasive growth and biofilm development**. *Proc Natl Acad Sci U S A*, v. 102, n. 15, p. 5576-5581, 2005.

LAU, C. W.; CHEN, Z. Y.; WONG, C. M.; YAO, X.; HE, Z.; XU, H.; HUANG, Y. **Attenuated endothelium-mediated relaxation by acteoside in rat aorta: Role of endothelial [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> and nitric oxide/cyclic GMP pathway**. *Life Sciences*, v. 75, p. 1149-1157, 2004.

LEE, J.Y.; WOO, E. R.; KANG, K. W. **Inhibition of lipopolysaccharide-inducible nitric oxide synthase expression by acteoside through blocking of AP-1 activation**. *Journal of Ethnopharmacology*, v. 97, p. 561-566, 2005.

LI, L.; TSAO, R.; YANG, R.; LIU, C.; YOUNG, J. C.; ZHU, H. **Isolation and purification of phenylethanoid glycosides from *Cistanche deserticola* by high-speed counter-current chromatography**. *Food Chemistry*, v. 108, p. 702-710, 2008.

LIMA, C. S. A. *et al.* **Antimicrobial activity of a mixture of two isomeric phenylpropanoid glycosides from *Arrabidaea harleyi* A.H. Gentry (Bignoniaceae)**. *Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences*, v. 39, n. 1, jan./mar., 2003.

LIMA, B. A. **Análise da atividade antimicrobiana de frações purificadas e extratos de invertebrados e microrganismos marinhos sobre *Streptococcus mutans* e influência sobre seus principais fatores de virulência**. 2009. 74f. Dissertação (Mestrado em Biologia Buco-Dental). Faculdade de Odontologia de Piracicaba. Universidade Estadual de Campinas. Piracicaba. 2009.

LIMA, V.; BEZERRA, M. M.; LEITÃO, R. F. C.; BRITO, G. A. C.; ROCHA, F. A. C.; RIBEIRO, R. A. **Principais mediadores inflamatórios envolvidos na fisiopatologia da periodontite – papel de moduladores farmacológicos**. *R. Periodontia*, v. 18, n. 3, p. 7-19, 2008.

LIMA JÚNIOR, J. F. *et al.* **O uso de fitoterápicos e a saúde bucal**, *Saúde em revista*, v. 7, n. 16, p. 11-17, 2005.

LIU, X. R.; LI, J. **Analyzing the production of organic acid of different genotype *Streptococcus mutans* isolated from children with different caries experience.** West China Journal of Stomatology, v. 28, n. 4, p. 404-407, 2010.

LOESCHE, W. J. **Chemotherapy of dental plaque infections.** Oral Sci Rev, v. 9, p. 63-107, 1976.

LOHINAI, Z.; BENEDEK, P.; ROSIVALL, L.; FEHÉR, E.; GYORFI, A.; FAZEKAS, A. **Protective effects of mercaptoethylguanidine, a selective inhibitor of inducible nitric oxide synthase in ligature-induced periodontitis in the rat.** Br J Pharmacol., n. 123, p. 353-60, 1998.

LUCAS, E.F.; SOARES, B.G.; MONTEIRO, E.E.C. **Caracterização de Polímeros: determinação de peso molecular e análise térmica.** Rio de Janeiro: Editora E-papers, 2001.

MACEDO-COSTA, M. R. *et al.* **Efeito antimicrobiano do extrato da *Myrciaria Cauliflora* Berg e *Matricaria Recutita* Linn. sobre microorganismos do biofilme dental.** Revista de Biologia e Farmácia, v. 4, n. 1, p.19-25, 2010.

MADIANOS, P. N.; BOBETSIS, Y. A.; KINANE, D. F. **Generation of inflammatory stimuli: how bacteria set up inflammatory responses in the gingiva.** J Clin Periodontol., v. 32, n. 6, p. 57-71, 2005.

MAGALHÃES, E. A. *et al.* **Avaliação do potencial genotóxico do extrato bruto de *Pyrostegia venusta* (Ker Gawl.) Miers, Bignoneaceae, em medula óssea de camundongos.** Revista Brasileira de Farmacognosia, v. 20, n. 1, p. 65-69, Jan./Mar. 2010a.

MAGALHÃES, C. F. **Efeito de extratos e frações de *Piper aduncum* sobre o crescimento e metabolismo dos *Streptococcus mutans* e *Streptococcus sanguis*.** 2010b. 52 p. Dissertação (Mestrado). Mestrado em ciências biológicas-imunopatologia das doenças infecciosas e parasitárias. Universidade do Vale do Rio Doce. Governador Valadares, 2010b.

MALAR, R. J. J.; JOHNSON, M.; UTHITH, M.; ARTHY, A. **Antibacterial activity of ethanolic extracts of selected medicinal plants against human pathogens.** Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine, p. S76-S78, 2011.

MALTZ, M.; CARVALHO, J. **Diagnóstico da doença cárie.** In: ABOPREV: Promoção de saúde bucal. São Paulo: Artes Médicas, p. 69-91, 1997.

MAREGESI, S.M., PIETERS, L., NGASSAPA, O.D., APERS, S., VINGERHOETS, R., COSC, P., BERGHE, D.A.V., VLIETINCK, A.J. **Screening of some Tanzanian medicinal plants from Bunda district for antibacterial, antifungal and antiviral activities.** Journal of Ethnopharmacology, v. 119, p. 58-66, 2008.

MARINHO, B. V. S.; ARAÚJO, A. C. S. **O Uso dos Enxaguatórios Bucais sobre a Gengivite e o Biofilme Dental.** International Journal of Dentistry, v. 6, n. 4, p. 124-131, 2007.

MARSH, P. D. **Host defense and microbial homeostasis: role of microbial interactions.** J Dent Res, n. 68, p. 1567-1575, 1989.

MARSH, P. D.; BOWDEN, G. H. **Microbial community interactions in biofilms. Community structure and co-operation in biofilms,** p. 167-198. Cambridge: Cambridge university press. 2000.

MARSH, P. D. **Are dental diseases examples of ecological catastrophes?** Microbiology, n. 149, p. 279-294, 2003.

MARSH, P. D. **Dental plaque as a biofilm and a microbial community – implications for health and disease.** BMC Oral Health, n. 6, p. 1-7, 2006.

MARSH, P. D. **Controlling the oral biofilm with antimicrobials.** Journal of dentistry n. 38, v. S1, p. S11–S15, 2010a.

MARSH, P. D. **Microbiology of dental plaque biofilms and their role in oral health and caries.** Dent Clin N Am, n. 54, p. 441–454, 2010b.

MCGEE, J. M.; TUCCI, M. A.; EDMUNDSON, T.P.; SERIO, C.L.; JOHNSON, R. B. **The relationship between concentrations of proinflammatory cytokines within gingiva and the sulcular depth.** J Periodontol., n. 69, p.865-71, 1998.

MELO, D. F.; SELL, A. M.; LOPES, C. M.; HIDALGO, M. M. **Viabilidade das células mononucleares de sangue periférico humano em diferentes meios de estocagem de dentes avulsionados.** Acta Scientiarum. Health Sciences, v. 25, n. 1, p. 69-74, 2003.

MENEZES, T. O. A. *et al.* **Avaliação *in vitro* da atividade antifúngica de óleos essenciais e extratos de plantas da região amazônica sobre cepa de *Candida albicans*.** Revista de Odontologia da UNESP, v. 38, n. 3, p. 184-91, 2009.

MIGLIATO, K. F. *et al.* **Controle da qualidade do fruto de *Syzygium cumini* (L.) Skeels,** Revista Brasileira de Farmacognosia, v. 17, n. 1, p. 94-101, Jan./Mar. 2007.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. **Pesquisa Nacional de Saúde Bucal. SB Brasil 2010. Resultados principais.** Secretaria de Atenção à Saúde/Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Atenção Básica. Coordenação Geral de Saúde Bucal. Brasília, DF, 2011.

MIYASE, T.; YAMAMOTO, R.; UENO, A. **Phenylethanoid glycosides from *Stachys officinalis*.** Phytochemistry, v.43, n.2, p.475 – 479, 1996.

MONTEIRO, A. M. D.; ARAÚJO, R. P. C.; GOMES FILHO, I. S. **Diabetes Mellitus tipo 2 e doença periodontal.** Rev. Gaúcha Odontol., Porto Alegre, v. 50, n.1, p.50-54, 2002.

MOREIRA, C. G. *et al.* **Hyperpigmentant activity of leaves and flowers extracts of *Pyrostegia venusta* on murine B16F10 melanoma.** Journal of Ethnopharmacology n. 141, p. 1005– 1011, 2012.

NASCIMENTO, D. F. F.; SILVA, A. M.; MARCHINI, L. **O papel das bactérias orais em doenças sistêmicas**. Revista ABO Nacional, v. 14, n. 2, p. 117-122, 2006.

NISHA, P. V.; N. SHRUTI, N.; SWAMY, K. S.; KUMARI, M.; VEDAMURTHY, A. B.; KRISHNA, V.; HOSKERI, J. H. **Anthelmintic activity of *Pyrostegia venusta* using *Pheretima posthuma***. International Journal of Pharmaceutical Sciences and Drug Research, v. 4, n. 3, p. 205-208, 2012.

NUNES, K. M.; BARBOSA, W. L. R.; OZELA, E. F.; SILVA JÚNIOR, J. O. C. S. **Padronização da Tintura de *Calendula officinalis* L. para seu Emprego em Formulações Semi-sólidas Fitoterápicas**. Lat. Am. J. Pharm., v. 28, n. 3, p. 344-50, 2009.

OHNO, T.; INOUE, M.; OGIHARA, Y.; SARACOGLU, I. Antimetastatic activity of acteoside, a phenylethanoid glycoside. **Biol. Pharm. Bull.**, v.25, n.5, p.666 – 668, 2002.

OLIVEIRA, A. B.; RASLAN, D. S.; MIRAGLIA, M. C. M.; MESQUITA, A. A. L.; ZANI, C. L.; FERREIRA, D. T.; MAIA, J. G. S. **Estrutura química e atividade biológica de naftoquinonas de Bignoniáceas brasileiras**. Química Nova 13(4), 1990.

OLIVEIRA, A. H.; BERRETTA, A. A. Revista Eletrônica de Farmácia v. 2, p. 169-74, 2007.

OOSHIMA, OSAKA, Y.; SASAKI, H.; OSAWA, K.; YASUDA, H.; MATSUMURA, M.; SOBUE, S.; MATSUMOTO, M. **Caries inhibitory activity of cacao bean husk extract in *in vitro* and animal experiments**. Arch. Oral Biol., n. 45, p. 639-645, 2000.

OTOBELLI, *et al.* **Estudo fitoquímico e atividade leishmanicida de *Vatairea guianensis* Aubl (Fabaceae)**. XXI Congresso Brasileiro de Parasitologia, II Encontro de Parasitologia do Mercosul, Sociedade Brasileira de Parasitologia, Revista Patologia Tropical, v. 38, supl. 2, jul-set. 2009.

OWER, P. C.; CIANTAR, M.; NEWMAN, H. N.; WILSON, M.; BULMAN, J. S. **The effects on chronic periodontitis of a subgingivally-placed redox agent in a slow release device**. J Clin Periodontol, n. 22, p. 494-500, 1995.

PALOMER, L. R. **Caries dental en el niño. Una enfermedad contagiosa**. Rev Chil Pediatr., v. 77, n. 1, p. 50-6, 2006.

PAPOUTSI, Z.; KASSI, E.; MITAKOU, S.; ALIGIANNIS, N.; TSIAPARA, A.; CHROUSOS, G. P.; MOUTSATSOU, P. **Acteoside and martynoside exhibit estrogenic/antiestrogenic properties**. Journal of Steroid Biochemistry & Molecular Biology, v. 98, p. 63–71, 2006.

PAQUETTE, D. W.; WILLIAMS, R. C. **Modulation of host inflammatory mediators as a treatment strategy for periodontal diseases**. Periodontology 2000, v. 24, p. 239–252, 2000.

PEDRAZZI, V.; SOUZA, S.; OLIVEIRA, R.; CIMÕES, R.; GUSMÃO, E. **Métodos mecânicos para o controle do biofilme dentário supragengival**. R. Periodontia, v. 19, n. 3, set./2009.

PEREIRA, A. C. *et al.* **Purification of an antibacterial compound from *Lantana lilacina***. Brazilian Journal of Pharmacognosy, v. 18, n. 2, p. 204-208, Abr./Jun. 2008.

PEREIRA, J. V. *et al.* **Efeito antibacteriano e antiaderente *in vitro* do extrato da *Punica granatum* Linn. sobre microrganismos do biofilme dental**. Revista Brasileira de Farmacognosia, v. 16, n. 1, p. 88-93, Jan./Mar. 2006a.

PEREIRA, J. V. *et al.* **In vitro antimicrobial activity of an extract from *Anacardium occidentale* Linn. on *Streptococcus mitis*, *Streptococcus mutans* and *Streptococcus sanguis***. Odontologia Clín Científ, v. 5, n. 2, p. 137-141, abr/jun., 2006b.

PETTIT, G.R.; NUMATA, A.; TAKEMURA, T.; ODE, R.H.; NARULA, A.S.; SCHMIDT, J.M.; CRAGG, G.M.; PASE, C.P. **Antineoplastic agents, 107. Isolation of acteoside and isoacteoside from *Castilleja linariaefolia***. J. Nat. Prod., v.53, n.2, p.456 – 8, 1990. Abstract.

PRISTA, L. N. *et al.* **Técnica Farmacêutica e Farmácia Galênica**. Fundação Calouste Gulbenkian: Lisboa 3. ed., v. 2, p. 183-207, 1990.

PUTZ, F.E.; WINDSOR, D.M. 1987. **Liana phenology on Barro Colorado Island, Panama**. Biotropica, n.19, p.334- 341.

RAHMATULLAH, M. *et al.* **An Ethnomedicinal, Pharmacological and Phytochemical Review of Some Bignoniaceae Family Plants and a Description of Bignoniaceae Plants in Folk Medicinal Uses in Bangladesh**. Advances in Natural and Applied Sciences, v. 4, n. 3, p. 236-253, 2010.

REHER, V.; ZENÓBIO, E.; COSTA, F.; REHER, P.; SOARES, R. **Nitric oxide levels in saliva increase with severity of chronic periodontitis**. Journal of Oral Science, v. 49, n. 4, p. 271-276, 2007.

RODRIGUES, M. M. *et al.* **Avaliação *in vitro* da atividade antifúngica do *Allium sativum* sobre cepas de *Candida albicans* isoladas de cavidade bucal**. Revista de Periodontia, v. 19, n. 2, p. 124-132, jun., 2009.

RODRIGUES, G. V.; MARCHETTO, O. **Análises térmicas**. In: XVII Seminário — Aplicação da Técnica de Análise Térmica voltada para Institutos Acadêmicos e Industriall Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2002.

ROSSATO, D. R.; KOLB, R. M. **Germinação de *Pyrostegia venusta* (Bignoniaceae), viabilidade de sementes e desenvolvimento pós-seminal**. Revista Brasil. Bot., v. 33, n. 1, p. 51-60, jan.-mar. 2010.

ROY, P. *et al.* **Preliminary study of the antioxidant properties of flowers and roots of *Pyrostegia venusta* (Ker Gawl) Miers.** BMC Complementary and Alternative Medicine, v. 11, n. 69, p. 1-8, 2011.

ROY, P. *et al.* **In vivo antioxidative property, antimicrobial and wound healing activity of flower extracts of *Pyrostegia venusta* (Ker Gawl) Miers.** J. Ethnopharmacol., p. 1-7, 2012.

SASAKI, E. Y. **Extratos das sementes de *Paullinia cupana*: avaliação fitoquímica, capacidade antioxidante e estudo preliminar microbiológico na prevenção da formação da placa dental.** 2006. 139f. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas). Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas. Universidade Estadual de Maringá. Maringá, 2006.

SASAKI, E. Y.; ITO, L. A.; CANTELI, V. C. D.; USHIROBIRA, T. M. A.; UEDA-NAKAMURA, T.; DIAS FILHO, B. P.; NAKAMURA, C. V.; MELLO, J. C. P. **Antioxidant capacity and in vitro prevention of dental plaque formation by extracts and condensed tannins of *Paullinia cupana*.** Molecules, n. 12, p. 1950-1963, 2007.

SANDWITH, N. Y., HUNT, D. R. **Bignoniaceas.** In: Reitz, P.R. (Ed.), Flora Illustrada Catarinense, Part I, Fasc. Bign. , p. 1–172, 1974.

SCACHETI, L. F.; MATOS, N. C.; MALLAFATI, L.; NAVARRO, F. F. **Controle de qualidade e análise sensorial em voluntários de xampu esfoliante com extrato hidroalcoólico de *Capsicum frutescens* L. (Solanaceae).** Rev Ciênc Farm Básica Apl., v. 32, n. 3, p. 369-374, 2011.

SCALON SP, VIEIRA MC, LIMA AA, SOUZA CM, MUSSURY RM. **Pregerminative treatments and incubation temperatures on the germination of “cipó-de-São-João” [*Pyrostegia venusta* (Ker Gawl.) Miers]-Bignoniaceae.** Rev. Brasileir. Plant. Med. 2008; 10: 37-42.

SCHAPOVAL, E.E.S.; DE VARGAS, M.R.W.; CHAVES, C.G.; BRIDI, R.; ZUANAZZI, J.A.; HENRIQUES, A.T. **Antiinflammatory and antinociceptive activities of extracts and isolated compounds from *Stachytarpheta cayennensis*.** J. Ethnopharmacol., v.60, p.53 – 59, 1998.

SENS, S. L. **Alternatives to Self-Sustainability of Indigenous Land Xokleng Morrow.** Florianópolis. Dissertação de mestrado. Program in Production Engineering, Universidade Federal de Santa Catarina, p. 386, 2002.

SHETTY, S.; BOSE, A.; SRIDHARAN, S.; SATYANARAYANA, A.; RAHUL, A. **A clinico–biochemical evaluation of the role of a herbal (ayurvedic) immunomodulator in chronic periodontal disease: a pilot study.** OHDM, v. 12, n. 2, p. 95-104, 2013.

SILVA, E.C.; PAOLA, M.V.R.V.; MATOS, J.R. **Análise térmica aplicada à cosmetologia.** Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas. v. 43, n. 3, jul./set., 2007.

SILVA, F. N. S.; CONCEIÇÃO, G. M.; ALMEIDA, D. B. **Ocorrência da Família Loranthaceae no Município de Caxias, Maranhão, Brasil.** Cadernos de Geociências, v. 7, n. 2, 2010.

SILVA, P. B. *et al.* **Avaliação do potencial alelopático, atividade antimicrobiana e antioxidante dos extratos orgânicos das folhas de *Pyrostegia venusta* (Ker Gawl.) Miers (Bignoniaceae),** Rev. Bras. Pl. Med., Botucatu, v. 13, n. 4, p. 447-455, 2011.

SILVA, R. M. G.; RODRIGUES, D. T. M.; AUGUSTOS, F. S.; VALADARES, F.; NETO, P. O.; SANTOS, L.; SILVA, L. P. **Antitumor and cytotoxic activity of *Kielmeyera coriacea* mart. Zucc. and *Pyrostegia venusta* (ker-gawl.) Miers extracts.** Journal of Medicinal Plants Research, v. 6, n. 24, p.4142-4148, Jun. 2012.

SILVA JÚNIOR, J. O. C.; VIEIRA, J. L. F.; BARBOSA, W.L.R.; PEREIRA, N.L. **Caracterização físico-química do extrato fluido e seco por nebulização de *Symphytum officinale* L.** Revista Brasileira de Farmacognosia, v.16 (supl.): Dez. 2006a

SILVA JÚNIOR, J. O. C. **Obtenção e avaliação de forma farmacêutica semi-sólida fitoterápica contendo extrato seco por nebulização de *Shymphytum officinale* L. (confrei).** Tese de doutorado / FCFRP- USP. 2006b.

SILVERSTEIN, R. M.; BASSLER, G. C.; MORRIL, T. C. **Identificação espectrométrica de compostos orgânicos.** 5ª edição, São Paulo: Guanabara Koogan, 1981, 387p, p. 85-130; Espectrometria no infravermelho.

SILVERSTEIN, R.M.; WEBSTER, F.X.; KIEMLE, D.J. **Identificação espectrométrica de compostos orgânicos.** 7ª edição, Editora: LTC, p. 86-87, 2006.

SOCRANSKY, S. S.; HAFFAJEE, A. D. **Dental biofilms: difficult therapeutic targets.** Periodontology 2000, v. 28, p. 12–55, 2002.

SOUZA, DE L. A.; SANTOS, G. DE O.; MOSCHETA, I. S. **Morfoanatomia floral de espécies lianescetes de Bignoniaceae.** IHERINGIA, Sér. Bot., Porto Alegre, v. 65, n. 1, p. 5-15, junho 2010a.

SOUZA, P. A. *et al.* **Evaluation of antimicrobial, antioxidant and phototoxic activities of extracts and isolated compounds from *Stachytarpheta cayennensis* (Rich.) Vahl, Verbenaceae.** Brazilian Journal of Pharmacognosy, v. 20, n. 6, p. 922-928, Dez. 2010b.

SOUZA, V. C.; LORENZI, H. **Botânica sistemática: guia ilustrado para identificação das famílias de Angiospermas da flora brasileira, baseado em APG II.** Nova Odessa: Instituto Plantarum de Estudos da Flora. 640p., 2005.

TAYLOR, J.; PRESHAW, P.; DONALDSON, P. **Cytokine gene polymorphism and immunoregulation in periodontal disease**. *Periodontology* 2000, v. 35, p. 158-182, 2004.

THEILADE, E. **The non-specific theory in microbial etiology of inflammatory periodontal diseases**. *J Clin Periodontol*, v. 13, p. 15-19, 1986.

THYLSTRUP, A.; FEJERSKOV, O. **Cariologia clínica**. 2. ed., São Paulo: Ed. Santos, 1995.

TOLEDO, C.; BRITTA, E.; CEOLE, L.; SILVA, E.; MELLO, J.; DIAS FILHO, B.; NAKAMURA, C.; NAKAMURA, T. **Antimicrobial and cytotoxic activities of medicinal plants of the Brazilian cerrado, using Brazilian cachaça as extractor liquid**. *Journal of Ethnopharmacology*, v. 133, p. 420–425, 2011.

TORRES, C. R. G.; KUBO, C. H.; ANIDO, A. A.; RODRIGUES, J. R. **Agentes antimicrobianos e seu potencial de uso na Odontologia**. *Pós-Grad Rev Fac Odontol São José dos Campos*, v.3, n.2, p., 2000

TUROLLA, M. S. R.; NASCIMENTO, E. **Informações toxicológicas de alguns fitoterápicos utilizados no Brasil**. *Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences*, v. 42, n. 2, Abr./Jun. 2006.

VANDRESEN, F. *et al.* **Constituintes químicos e avaliação das atividades antibacteriana e antiedematogênica de *Aloysia gratissima* (Gillies & Hook.) Tronc. e *Aloysia virgata* (Ruiz & Pav.) Pers., Verbenaceae**. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, v. 20, n. 3, p. 317-321, Jun./Jul. 2010.

VELOSO, C. C.; BITENCOURT, A. D.; CABRAL, L. D.; FRANQUI, L. S.; DIAS, D. F.; DOS SANTOS, M. H.; SONCINI, R.; GIUSTI-PAIVA, A. ***Pyrostegia venusta* attenuate the sickness behavior induced by lipopolysaccharide in mice**. *Journal of Ethnopharmacology*, v. 132, p. 355-358, 2010.

VELOSO, C. C.; BITENCOURT, A. D.; CABRAL, L. D.; FRANQUI, L. S.; SANTA-CECÍLIA, F. V.; DIAS, D. F.; SONCINI, R.; VILELA, F. C.; GIUSTI-PAIVA, A. **Anti-inflammatory and antinociceptive effects of the hydroethanolic extract of the flowers of *Pyrostegia venusta* in mice**. *Brazilian Journal of Pharmacognosy*, v. 22, n. 1, p. 162-168, Jan./Fev. 2012.

WENDLANDT, W.W. **Thermal Analysis**. New York: John Wiley & Sons, 3.ed. 1986.

XIE, J.; TAN, F.; ZHU, J.; YUE, C.; LI, Q. **Separation, purification and quantification of verbascoside from *Penstemon barbatus* (Cav.) Roth**. *Food Chemistry*, v. 135, p. 2536–2541, 2012.

XIE, L.; WANG, X.; BASNET, P.; MATSUNAGA, N.; YAMAJI, S.; YANG, D.; CAI, S.; TANI, T. **Evaluation of variation of acteoside and three major flavonoids in wild and cultivated *Scutellaria baicalensis* roots by micellar electrokinetic chromatography**. *Chem. Pharm. Bull.*, v. 50, n. 7, p. 896-899, 2002.

ZANATTA, F.B.; RÖSING, C. K. **Clorexidina: mecanismo de ação e evidências atuais de sua eficácia no contexto do biofilme supragengival.** Scientific-A, v. 1, n. 2, p. 35-43, 2007.

ZHAO, J.; LIU, T.; MA, L.; YAN, M.; ZHAO, Y.; ZHENG YI, G.; HUANG, Y. **Protective effect of acteoside on immunological liver injury induced by *Bacillus Calmette-Guerin* plus lipopolysaccharide.** Planta Med, v. 75. 14, p. 1463-9, nov. 2009.