



CIÊNCIAS DA SAÚDE

Efeito do óleo de copaíba na adesão de células e viabilidade de células-tronco mesenquimais

Effect of copaiba oil on cell adhesion and viability of mesenchymal stem cells

Daniela Guerra Lund¹; Daikelly Iglesias Braghirolli²; Yakime Brito Adrião³; Miriam Anders Apel⁴; Eduardo Luis Konrath⁵; Patricia Helena Lucas Pranke⁶

RESUMO

A oleorresina de copaíba é amplamente utilizada como medicamento tradicional pelos índios da Amazônia, por meio da administração oral e tópica. Este produto natural possui propriedades anti-microbianas, anti-inflamatórias, anti-tumorais e também cicatrizantes. No presente estudo, o efeito da oleorresina da copaíba na viabilidade celular e na adesão de células-tronco mesenquimais foi avaliado *in vitro*. A concentração de óleo utilizada neste trabalho foi de 0,5 µg / mL durante um período de 7 dias. Os resultados mostraram que não houve diferença estatística para adesão celular. A análise do MTT indicou que não houve diferença estatística em relação à absorbância média no período de quatro horas para 1 dia. No entanto, ambos diferiram significativamente da absorbância média nos dias 3 e 7. Embora não haja diferença estatística entre os tratamentos, o óleo de copaíba não foi citotóxico.

Palavras-chave: Oleorresina; Cultura de células-tronco; Óleo amazônico.

ABSTRACT

Copaiba oleoresin is widely used as a traditional medicine by the Amazonian Indians, through oral and topical administration. This natural product possesses anti-microbial, anti-inflammatory, anti-tumoral and also wound healing properties. In the present study, the effect of copaiba oleoresin on cellular viability and adhesion of mesenchymal stem cells was evaluated in vitro. The concentration of oil used in this work was 0.5 µg/mL during a 7 day period. The results showed that there was no statistical difference for cell adhesion. The MTT analysis indicated that there was no statistical difference in relation to the mean absorbance in the time period of four

¹ Instituto Federal Sul-rio-grandense - IFSul, Pelotas/RS - Brasil. E-mail: dguerralund@yahoo.com.br

² Universidade Federal do Rio Grande do Sul - UFRGS, Porto Alegre/RS. E-mail: daikelly@yahoo.com.br

³ Universidade Federal do Rio Grande do Sul - UFRGS, Porto Alegre/RS. E-mail: yakime.adriao@ufrgs.br

⁴ Universidade Federal do Rio Grande do Sul - UFRGS, Porto Alegre/RS. E-mail: edukonrath@farmacia.ufrgs.br

⁵ Universidade Federal do Rio Grande do Sul - UFRGS, Porto Alegre/RS. E-mail: edukonrath@farmacia.ufrgs.br

⁶ Universidade Federal do Rio Grande do Sul - UFRGS, Porto Alegre/RS. E-mail: patriciapranke@ufrgs.br

hours to 1 day. However, both differed significantly from the mean absorbance at days 3 and 7. Although there is no statistical difference between the treatments, copaiba oil was not cytotoxic.

Keywords: Oleoresin; Stem cells culture; Amazonian oil.

1. INTRODUÇÃO

A oleorresina de copaíba é um importante produto natural tradicionalmente utilizado pelas populações amazônicas brasileiras, produzido pela exsudação dos troncos das árvores pertencentes à espécie *Copaifera* (Leguminosae - Caesalpinoideae). A árvore *Copaifera* spp é prevalente em todo o Brasil e também é encontrada do nordeste da Argentina à Venezuela, onde tem um impacto social e econômico considerável, devido à dependência da extração de óleo para a subsistência das populações locais (VEIGA JUNIOR; PINTO, 2002). Muitas aplicações farmacológicas já foram descritas para o óleo, como suas propriedades antimicrobianas, antiinflamatórias e antitumorais, incluindo seu uso como agente tradicional de cicatrização de feridas (WANG *et al.*, 2011). Foi verificado que, assim como para a leishmaniose, o óleo de copaíba foi eficaz no tratamento de camundongos infectados com *Trypanosoma evansi*, protozoário que infecta equinos, cães, capivaras dentre outros animais causando febres intermitentes, edema nas pernas e partes baixas do animal, aborto (DORNELES *et al.*, 2013). Outros estudos demonstraram que o ácido caurenóico, um diterpeno de *Copaifera langsdorffii*, apresentou potencial antiinflamatório induzido pelo ácido acético, na colite de ratos (PAIVA *et al.*, 2002). A associação entre produtos naturais e medicina regenerativa ou engenharia de tecidos é promissora em termos da capacidade de reconstituir órgãos (VIERLING *et al.*, 2014). A engenharia de tecidos envolve o uso de estruturas de células, chamadas de estruturas de apoio, que consistem em estruturas tridimensionais que fornecem um microambiente que favorece a adesão e a migração celular (NEDEL *et al.*, 2009). Implantes de células-tronco mesenquimais com scaffolds têm sido utilizados em vários estudos para reconstruir e reparar a funcionalidade de vários órgãos, como pele, pulmões, vasos, rins e fígado, entre outros (WANG *et al.*, 2011). Certos componentes inseridos em scaffolds, como alginato e agarose, têm sido usados para melhorar a adesão, viabilidade e diferenciação de células-tronco (WANG *et al.*, 2011; WONG *et al.*, 2012). Estudos demonstraram que o hidrogel de alginato (HA) associado ao dióxido de titânio nano / micro fibra (nfTD) e hidroxiapatita (nfHY) formam um ambiente propício à viabilidade e adesão celular (SANTANA *et al.*, 2012). Da mesma forma, produtos naturais, como o óleo de copaíba, foram combinados com scaffolds para proporcionar um ambiente similar no qual a célula está inserida e promover melhor aderência e proliferação celular (VEIGA JUNIOR; PINTO, 2002).

Portanto, o uso de células-tronco mesenquimais associadas a produtos naturais pode promover a diferenciação em diferentes tipos de células e ser usado para a regeneração de vários tipos de tecidos.

O objetivo do presente estudo foi avaliar os efeitos da oleorresina de copaíba na adesão celular e na viabilidade de células-tronco mesenquimais.

2. MATERIAIS E MÉTODOS

2.1. CULTURA DE CÉLULAS-TRONCO MESENQUIMAIS

Experimentos e análises foram realizados no Laboratório de Hematologia e Células-Tronco da Universidade Federal do Rio Grande do Sul - UFRGS.

Células-tronco mesenquimais da polpa dos dentes decíduos foram utilizadas. O estudo utilizado foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa (CEP / UFRGS) sob nº 27325. Para os experimentos, células entre a quinta e a nona passagem, foram utilizadas e cresceram em DMEM - Meio Eagle Modificado por Dulbeccos (Sigma-Aldrich), suplementado com 10% de soro bovino fetal (Invitrogen®, Frederick, EUA).

Quando se atingiu aproximadamente 90% de confluência, as culturas foram tripsinizadas com a utilização de 0,25% de Tripsina / EDTA. As células dissociadas foram então semeadas a uma densidade de 3×10^5 células / poço em placas de cultura de 24 poços.

A superfície das placas de cultura celular foi pré-tratada com 0,1% de gelatina (Sigma-Aldrich®, St Louis, EUA) mais 1% de dimetilsulfóxido (DMSO) e 0,05% de óleo de copaíba pura foi obtido da Alpha Química Ind. Foi acompanhado de um relatório especificando qualidade com análises físico-químicas e microbiológicas do óleo, enviado pela empresa que forneceu o óleo. Para o controle, foram utilizadas apenas células e meio de cultura - DMEM.

As placas foram mantidas em incubadora umidificada com 5% de CO₂ a 37° C.

2.2. ENSAIO PARA VIABILIDADE CELULAR

A viabilidade celular foi avaliada por ensaio colorimétrico (3 - (4,5-dimetiltiazol-2YL) - 2,5-difenil brometo de tetrazólio) - MTT. As avaliações foram realizadas nos períodos de 4 horas, 1, 3 e 7 dias. Em cada período de tempo, as células foram incubadas com 0,25 mg / mL de solução salina tamponada com MTT, livre de cálcio e magnésio - CMF, durante duas horas. O dimetilsulfóxido (DMSO) foi usado para dissolver os cristais de formazan e a absorbância foi lida no espectrofotômetro em dois comprimentos de onda: 570nm e 630nm. Os resultados foram calculados como a diferença na absorbância entre esses comprimentos de onda e expressos como o valor da média do quadruplicado para cada grupo. A leitura da absorbância foi realizada em equipamentos SpectraMax. O tamanho da amostra (n) foi igual a 3.

2.3. TESTE PARA ADESÃO CELULAR

Para este propósito, 30.000 células-tronco mesenquimais foram semeadas na superfície tratada das placas de cultura com 24 poços tratados com: 0,1% de gelatina (Sigma) e 1% de dimetil sulfóxido (DMSO) e 0,05% de óleo de copaíba. O grupo controle continha apenas a gelatina. Culturas primárias de células-tronco mesenquimais da polpa de dentes decíduos foram utilizados em triplicata. Quatro horas após as células terem sido semeadas nos poços, os poços com células foram lavados em PBS 1X com solução salina tamponada com fosfato (PBS) e colocados em

paraformaldeído a 4%. Após vinte minutos, os poços foram lavados novamente em PBS e mantidos lá até o momento da coloração. O corante marcador foi colocado em cada cavidade, (brometo de [3- (4,5-dimetiltiazol-2-il) -2,4-difeniltetrazólio]) (DAPI) diluído em PBS. Este procedimento foi realizado no escuro. O tamanho da amostra (n) foi igual a 3. As fotos foram tiradas em magnitude 200X em nove pontos aleatórios de cada poço, a partir de imagens obtidas do microscópio óptico de lente invertida. Um número médio de células foi realizado por poço.

2.4. ANÁLISE DA OLEORRESINA DE COPAÍBA UTILIZANDO CROMATOGRAFIA GASOSA

Para determinar os compostos presentes em *Copaifera* sp. oleorresina, foi utilizada a cromatografia gasosa, acoplada à espectrometria de massas (CG / EM).

A análise foi realizada usando um cromatógrafo a gás Shimadzu GC17-A e um detector de espectro de massa QP-5000 (MSD). A cromatografia foi realizada em uma coluna capilar DB-5 MS (25 m × 250 µm i.d., com uma espessura de filme de 0,25 µm; 5% dimetilpolisiloxano a 95% com difenil reticulado (John Wiley & Sons Scientific, EUA). As amostras de óleo foram diluídas em éter dietílico (2%, concentração final). Foram divididas as injeções (1 mL), em uma relação de divisão de 5:1. A temperatura do forno foi programada para subir a 3° C / min a partir de uma temperatura inicial de 60° C, aumentando até 300° C (80 min). As temperaturas de injeção, interface e fonte foram ajustadas em 220° C, 280° C e 250° C, respectivamente. O hélio foi usado como gás de transporte com uma taxa de fluxo de 1,0 ml / min. A detecção de MS foi implementada com o modo de ionização de elétrons (energia de elétrons de 70 eV) e a faixa de massa utilizada foi de 50 a 650 m / z. Compostos na amostra autoclavada e não autoclavada de *Copaifera* spp. óleo foram identificados com base em seus índices de retenção linear (LRI), determinados em relação aos tempos de retenção de uma série de misturas selecionadas de n-hidrocarbonetos. As identificações individuais foram feitas examinando-se a biblioteca espectral de massa de referência do sistema GC-MS e também analisando seus perfis característicos de fragmentação quando comparados com os dados da literatura (TAPPIN *et al.*, 2004; ADAMS, 2001). As proporções relativas dos constituintes dos óleos foram calculadas por integração eletrônica das áreas de pico do FID usando o método de normalização.

2.5. ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os resultados, quanto à viabilidade e adesão celular, foram analisados por ANOVA, seguido pelo Teste de Tukey. O nível de significância foi de 5%. Não ocorreu homogeneidade da variância e as variáveis foram transformadas usando a transformação Power 0.2.

3. RESULTADOS

3.1. O EFEITO DO ÓLEO DE COPAÍBA NA ADESÃO CELULAR

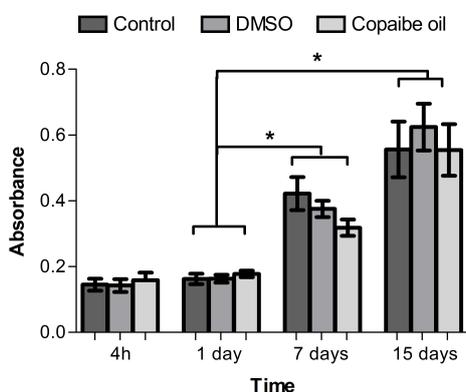
O teste ANOVA não mostrou diferença estatisticamente significativa entre o grupo controle em relação à adesão celular. Embora não estatisticamente significativa, $p =$

0,053 os dados mostram uma tendência de melhora da adesão celular nos poços tratados com óleo.

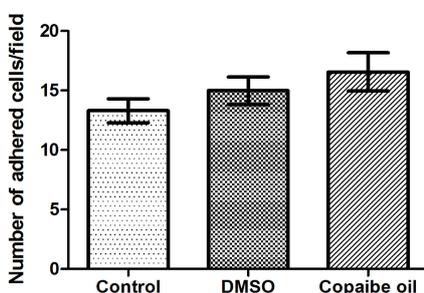
3.2. O EFEITO DO ÓLEO DE COPAÍBA NA VIABILIDADE CELULAR

Os resultados do MTT (figura 1) mostraram que houve significância estatística ($p = 0,028$). Pode-se observar que o efeito do fator tempo também foi significativo ($p < 0,001$). Através do teste de Tukey, a absorbância média, referente ao tratamento durante quatro horas não diferiu significativamente da absorbância média para o tratamento referente 1 dia. Ambos os períodos de tempo, 4 horas e 1 dia, diferiram significativamente da absorbância média nos dias 3 e 7 ($p < 0,001$). Houve um aumento no número de células metabolicamente ativas ao longo do tempo de análise. A viabilidade celular aumentada foi encontrada nos poços previamente tratados com o óleo ao longo do tempo. Nenhum efeito citotóxico foi observado na concentração de óleo de $0,5 \mu\text{L} / \text{mL}$.

Figura 1 - Avaliação da viabilidade celular e valores da absorbância após 4 horas, 1, 3 e 7 dias (A) e avaliação da adesão celular após 4 horas (B).



(A)



(B)

3.3. CROMATOGRAFIA GASOSA DE OLEORRESINA DE COPAÍBA AUTOCLAVADA

A figura 2 e a tabela 1 representam o cromatograma da amostra da oleorresina de copaíba autoclavada utilizada nos experimentos e os principais constituintes encontrados, respectivamente. Como mostrado, os sesquiterpenos são predominantes

na amostra, com óxido de cariofileno (51,9%) e gama-elemeno (16,3%) como os compostos mais abundantes. A oleorresina não autoclavada de copaíba apresentou maior teor de óxido de cariofileno (85,4%) e presença de epóxido de humuleno (7,6%) (dados não mostrados). Resultados anteriores também demonstraram a prevalência de cariofileno em uma *Copaifera* spp. amostra de oleorresina, juntamente com outros sesquiterpenos (SANTANA *et al.*, 2012).

Figura 2 - Cromatograma da oleorresina de copaíba autoclavada obtida em um GC Shimadzu GC17-A e um detector QP-5000 MS. Os picos mostram os diferentes componentes apresentados no óleo de copaíba, conforme tabela 1, tempo de retenção e quantidade (%) de cada componente analisado.

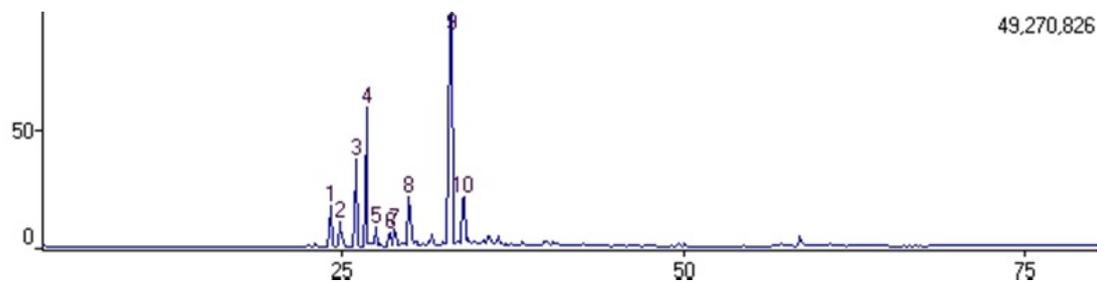


Tabela 1 - Análise dos constituintes da oleorresina de copaíba autoclavada por GC/MS.

Número de Pico	Tempo de Retenção	Componente	Quantidade (%)
1	24.168	alfa-copaeno	4.26
2	24.908	beta-elemeno	2.28
3	26.041	beta-cariofileno	9.92
4	26.848	gama-elemeno	16.28
5	27.491	alfa-humuleno	1.75
6	28.509	gama-muuroleno	1.27
7	28.876	não-identificado	1.77
8	29.931	beta-bisaboleno	5.14
9	32.997	óxido de cariofileno	51.93
10	33.920	epóxido de humuleno II	5.39

4. DISCUSSÃO

O objetivo do presente estudo foi avaliar os efeitos da oleorresina de copaíba na adesão celular e na viabilidade de células-tronco mesenquimais. Os resultados mostraram que não houve diferença estatística na adesão celular entre os grupos, mas uma tendência para um aumento na adesão celular com o tratamento com óleo. Investigações anteriores relataram que o uso de produtos naturais associados a scaffolds mostram resultados promissores em termos de melhor adesão e viabilidade celular (WANG *et al.*, 2011). Um exemplo importante foi o gel de Aloe vera associado à quitosana, o que contribuiu para uma melhor adesão dos fibroblastos na superfície dessas membranas (SILVA *et al.*, 2013). Esta associação com as membranas de quitosano melhorou as propriedades físicas das mesmas e melhorou a estabilidade da adesão celular. Estudos sobre proliferação celular foram realizados com células MDBK (Madin Darby Bovine Kidney) sob influência de diferentes concentrações de oleorresina de copaíba. Diluições de 0,1 mL deste óleo estavam entre 10^{-1} e 10^{-7} na concentração 10^{-5} . O óleo de copaíba teve ação positiva sobre a proliferação celular

com uma taxa 5,4 maior que a do grupo controle (o qual não apresentava o óleo) (NOGUEIRA *et al.*, 2012).

A concentração da oleorresina utilizada neste trabalho (0,5 µg / mL) facilitou a proliferação celular sem citotoxicidade detectada nas células. Estes resultados foram satisfatórios porque o trabalho atual demonstrou que as células aumentaram sua proliferação ao longo do tempo até 7 dias em todos os tratamentos e não houve morte celular. Verificou-se também que da quantidade total de oleorresina de copaíba utilizada (0,5 µL / mL ou 0,05% por poço na placa de cultura), apenas 0,037% permaneceu nos poços o que pode representar uma utilização efetiva do óleo, uma boa penetração e ação dos mesmos nas células.

Os principais componentes encontrados na oleorresina de copaíba após a esterilização foram identificados como sesquiterpenos. com predominância de óxido de cariofileno (51,9%). alfa-humuleno (1,7%) e beta-cariofileno (9,9%). Estudos sobre a composição química avaliada pela análise por GC / MS da oleorresina de diferentes espécies de *Copaifera* localizadas na Amazônia brasileira demonstraram algumas pequenas diferenças. mas o cariofileno foi encontrado em todos eles como o composto principal (CASCON; GILBERT, 2000). Um exemplo é a oilresina de *Copaifera multijuga*. que revelou a presença de sesquiterpenos. principalmente cubenol (16,7%). óxido de cariofileno (11,5%), beta-cariofileno (9,2%) e bisabolol (7,2%). junto com diterpenos. tal como o ácido copálico (2,1%). beta-hidroxi-3 copálico (1,7%) e ácido pinifólico (1,7%) (TAPPIN *et al.*, 2004). O ácido copálico foi originalmente considerado como um marcador químico para a espécie; Contudo. está presente apenas em traços comparados à grande predominância do cariofileno. o que dificulta a quantificação desse composto em amostras de óleo-resina. No presente estudo. as concentrações de componentes presentes no óleo foram diferentes em comparação com os resultados de estudos usando copaíba. Em estudos utilizando cromatografia gasosa de alta resolução, verificou-se que os principais componentes do óleo de copaíba. os ácidos sesquiterpeno e diterpeno. estavam presentes em várias espécies de óleo de copaíba. embora não necessariamente na mesma concentração. Isso pode mudar de acordo com a espécie copaíba (TAPPIN *et al.*, 2004).

O β-cariofileno e seu óxido estão comumente presentes nas oleorresinas da copaíba, mas não se restringem a este gênero. sendo encontrado também em óleos voláteis de muitas outras espécies de plantas. Várias atividades biológicas *in vitro* e *in vivo* são atribuídas ao β-cariofileno. tais como anti-inflamatório, antiviral, antinociceptivo e antioxidante (GERTSCH *et al.*, 2008; ASTANI *et al.*, 2011; GHELARDINI *et al.*, 2001). Além disso. Este composto recentemente demonstrou uma capacidade de proteger as células gliais contra o estresse oxidativo induzido pelo glutamato. modulando a resposta antioxidante celular (ASSIS *et al.*, 2014). Por causa disso. Este sesquiterpeno foi considerado no presente estudo como marcador fitoquímico e farmacológico.

Portanto, foi importante verificar a associação entre células-tronco mesenquimais e produtos naturais para verificar o óleo de copaíba devido às atividades biológicas desses óleos e a possibilidade de eles serem capazes de aumentar a adesão e proliferação celular sem serem citotóxicos.

5. CONCLUSÃO

No presente estudo, os resultados mostraram que, o óleo de copaíba promoveu aumento da viabilidade celular de células-tronco mesenquimais da polpa de dentes descíduos, ao longo do tempo e, foi verificada, uma tendência de melhora da adesão celular nos poços tratados com óleo. Não foi constatado nenhum efeito citotóxico na concentração utilizada de 0,5 µL / mL. Porém, novos estudos devem ser realizados com o óleo de copaíba utilizando-se diferentes concentrações.

6. AGRADECIMENTOS

Esta pesquisa contou com apoio financeiro do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e do Instituto de Pesquisa com Células-Tronco (IPCT).

7. DECLARAÇÕES DE INTERESSE

Os autores não relatam declarações de interesse.

8. REFERÊNCIAS

- ADAMS, R. **Identificação de componentes do óleo essencial por cromatografia gasosa / espectroscopia de massa quadrupolar**. Illinois: Allured Pub Corp., 2001.
- ASSIS, L. C.; STRALIOTTO, M. R.; ENGEL, D.; HORT, M. A.; DUTRA, R. C.; DEBEM, A. F. O β -Caryophyllene protege as células do glioma C6 contra a excitotoxicidade induzida pelo glutamato através da via Nrf2. **Neurociências**, v.279, p.220-231, 2014.
- ASTANI, A.; REICHLING, J.; SCHNITZLER, P. Triagem de atividades antivirais de compostos isolados de óleos essenciais. **Evidence-based Complementary and Alternative Medicine**, Art. ID 253643, p.1-8, 2011.
- CASCON, V.; GILBERT, B. Caracterização da composição química de oleorresinas de *Copaifera guianensis* Desf., *Copaifera duckei* Dwyer e *Copaifera multijuga* Hayne. **Phytochemistry**, v.55, p.773-778, 2000.
- DORNELES, F. S.; SILVA, A. S.; OLIVEIRA, C. B.; ZIMMERMANN, C. E. P.; ROSA, L. D.; TONIN, A. A.; OLIVEIRA, E. C. P.; SANTURIO, J. M.; MONTEIRO, S. G. Susceptibility of *Trypanosoma evansi* in the Copaiba Oil: In Vitro Test and in Mice Experimentally Infected with the Parasite. **Acta Scientiae Veterinariae**, v.41, n.1136, 2013.
- GERTSCH, J.; LEONTI, M.; RADUNER, S.; RACZ, I.; CHEN, JZ, XIE, XQ, ALTMANN, KH, KARSAK, M.; ZIMMER, A. Beta-caryophyllene é um cannabinoide dietético. **Proceedings of the National Academy of Sciences USA**, v.105, p.9099-9104, 2008.
- GHELARDINI, C.; GALEOTTI, N.; DI CESARE MANNELLI, L.; MAZZANTI, G.; BARTOLINI, A. Atividade anestésica local de beta-caryophyllene. **Farmaco**, v.56, p.387-389, 2001.
- NEDEL, F.; ANDRÉ, D. E.; DE OLIVEIRA, I. O.; CORDEIRO, M. M.; CASAGRANDE, L.; TARQUINIO, S. B.; NOR, J. E.; DEMARCO, F. F. Células-tronco: potencial terapêutico em odontologia. **Journal of Contemporary Dental Practice**, v.10, p.90-96, 2009.

NOGUEIRA, E.; NOVAES, A.; SANCHEZ, C. Avaliação do efeito do óleo-resina de copaíba (Conífera sp.) Na proliferação celular in vitro. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, v.49, p.293-300, 2012.

PAIVA, L. A. F.; GURGEL, L. A.; SILVA, R. M.; TOMÉ, A. R.; GRAMOSA, N. V.; SILVEIRA, E. R.; SANTOS, F. A.; RAO, V. S. N. Anti-inflammatory effect of kaurenoic acid, a diterpene from *Copaifera langsdorffii* on acetic acid-induced colitis in rats. **Vascular Pharmacology**, v.39, p.303-307, 2002.

SANTANA, B. P.; PAGANOTTO, G.F.; NEDEL, F.; PIVA, E.; DE CARVALHO, R. V.; NÖR, J. E., DEMARCO, F. F.; CARREÑO, N. L. Nano- / andaime de microfibra para engenharia de tecidos: propriedades físicas e biológicas. **Journal of Biomedical Materials Research Part A**, v.100, p.3051-3058, 2012.

SILVA, S. S.; CARIDADE, S. G.; MANO, J. F.; REIS, R. L. Efeito da reticulação em membranas à base de quitosana / aloe vera para aplicações biomédicas. **Carbohydr Polym**, v.98, p.581-588, 2013.

TAPPIN, M.; PEREIRA, J.; LIMA, L.; SIANI, A.; MAZZEI, J.; RAMOS, M. Análise química quantitativa para a padronização do óleo de copaíba por cromatografia em fase gasosa de alta resolução. **Química Nova**, v.27, p.236-240, 2004.

VEIGA JUNIOR, V. F.; PINTO, A. C. O GÊNERO *Copaifera* L. **Química Nova**, v.25, p.273-286, 2002.

VIERLING, C.; BAUMGARTNER, C.M.; BOLLERHEY, M.; ERHARDT, W. D.; STAMPFL, A.; VIERLING, W. O efeito vasodilatador de um extrato de *Hintonia latiflora* com ação antidiabética. **Phytomedicine**, v.21, p.1582-1586, 2014.

WANG, J.; MA, H.; JIN, X.; HU, J.; LIU, X.; N., L.; MA, P. X. O efeito da arquitetura de andaimes na diferenciação odontogênica de células-tronco da polpa dental humana. **Biomaterials**, v.32, p.7822-7830, 2011.

WONG, H. L.; SIU, W. S.; SHUM, W. T.; GAO, S.; LEUNG, P. C.; KO, C. H. Aplicação de fitoterápicos chineses para revitalizar células-tronco adultas para regeneração tecidual. **Chinese Journal of Integrative Medicine**, v.18, p.903-908, 2012.

Submissão em: **17/07/2018**

Aceito em: **24/10/2018**