



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS  
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO  
EM ODONTOLOGIA**

**FORMULAÇÃO DE ENXAGUATÓRIO BUCAL À BASE  
DE EXTRATO DE *Libidibia ferrea***

**GISELY NAURA VENÂNCIO**

**MANAUS - AM  
2014**



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS  
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO  
EM ODONTOLOGIA**

**FORMULAÇÃO DE ENXAGUATÓRIO BUCAL À BASE  
DE EXTRATO DE *Libidibia ferrea***

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Odontologia da Universidade Federal do Amazonas, como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Odontologia.

**GISELY NAURA VENÂNCIO**

**ORIENTADORA: PROF<sup>a</sup>. DR<sup>a</sup>. NIKEILA CHACON DE OLIVEIRA CONDE**

**CO-ORIENTADORA: PROF<sup>a</sup>. DR<sup>a</sup>. MARIA FULGÊNCIA COSTA LIMA BANDEIRA**

**MANAUS - AM  
2014**

Ficha Catalográfica  
(Catalogação realizada pela Biblioteca Central da UFAM)

Venâncio, Gisely Naura

V448f      Formulação de enxaguatório bucal à base de extrato de  
*Libidibia ferrea* / Gisely Naura Venâncio. – Manaus, 2014.

117f. il. color.

Dissertação (mestrado em Odontologia) – Universidade  
Federal do Amazonas.

Orientador: Pro<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Nikeila Chacon de Oliveira Conde

1. Higiene bucal 2. Plantas medicinais 3. Higiene oral I.  
Conde, Nikeila Chacon de Oliveira (Orient.) II.  
Universidade Federal do Amazonas III. Título

CDU 2007 581.19: 616.31-089(043.3)

# **GISELY NAURA VENÂNCIO**

## **Formulação de enxaguatório bucal à base de extrato de *Libidibia ferrea***

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Odontologia da Universidade Federal do Amazonas, como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Odontologia.

Aprovada em 11 de abril de 2014.

### **BANCA EXAMINADORA**

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Nikeila Chacon de Oliveira Conde, UFAM

Presidente

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Karen Regina Carim da Costa, UFAM

Membro

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Carina Toda, UFAM

Membro

A Deus, meu pai, minha  
mãe, minha irmã, meu  
namorado e todos os  
amigos pelo incentivo  
para a concretização  
deste trabalho.

## AGRADECIMENTOS

A Deus pela vida, saúde e força, sendo meu protetor em todos os momentos da minha vida.

A minha família, especialmente ao meu pai, minha mãe e minha irmã, por sempre me apoiarem a progredir profissionalmente e ao meu namorado Paulo Vitor, por todo o amor, apoio e atenção dedicados a mim durante a realização da minha pesquisa.

A querida Raquel de Oliveira Marreiro, por ter sido um verdadeiro anjo que Deus colocou na minha vida. Muito obrigada por todas as palavras de conforto, consolo, por todo o conhecimento transmitido e pela disponibilidade em me ajudar no laboratório e em tudo o que precisei, sendo sempre muito prestativa, atenciosa e meiga.

A minha orientadora professora Dr<sup>a</sup>. Nikeila Chacon de Oliveira Conde, por ter aceitado me orientar, pelo carinho, pela forma serena e tranquila de conduzir a pesquisa.

A minha coorientadora, professora Dr<sup>a</sup>. Maria Fulgência Costa Lima Bandeira, por toda a atenção, interesse na minha pesquisa, auxílio, generosidade e incentivo ao longo dessa caminhada.

À professora Dr<sup>a</sup>. Tatiane Pereira de Souza, por ter sido essencial na adequação da formulação do enxaguatório.

Ao professor Dr. Fábio Sampaio, por toda a contribuição dada para a melhoria da qualidade do meu trabalho.

À professora Dr<sup>a</sup>. Maria Francisca Simas Teixeira e a querida Taciana de Amorim Silva, por terem me recebido tão bem no laboratório de Micologia da UFAM, me dando todo o suporte e apoio necessários para a finalização da minha pesquisa.

À professora Dr<sup>a</sup>. Marne Carvalho de Vasconcellos por toda a generosidade e atenção, disponibilizando alunas do mestrado para me auxiliar no desenvolvimento da pesquisa.

Aos professores Dr. Leandro de Moura Martins e Dr<sup>a</sup>. Patrícia Lopes Pinto, pela contribuição e atenção para a concretização dessa pesquisa.

Às professoras Dr<sup>a</sup>. Karen Regina Carim da Costa e Dr<sup>a</sup>. Carina Toda, por terem aceitado participar da minha banca, contribuindo com seus conhecimentos e observações para a melhoria do trabalho realizado.

Ao professor Dr. Emerson Silva Lima, pela permissão de uso do laboratório da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da UFAM.

À professora Dr<sup>a</sup>. Maria Jacirema Ferreira Gonçalves, por ter sido uma fonte de inspiração e um exemplo de profissional a ser seguido, sempre me incentivando a seguir em frente.

Ao professor Mestre Francisco Pantoja Braga, pela contribuição e incentivo para a publicação de artigos científicos.

Aos professores Dr. Emílio Carlos Sponchiado Júnior e Dr<sup>a</sup>. Maria Augusta Bessa Rebelo, pela enorme contribuição na coordenação do Mestrado.

A Isis Costa Rodrigues por todo o suporte e atenção para o desenvolvimento do enxaguatório e Carolina Carvalho Pacheco, por sempre estar disposta a me ajudar.

À amiga Carolina Rocha Augusto por ter sido tão generosa, atenciosa e minha fonte de inspiração ao longo desse mestrado.

À amiga Rosiclei Lourenço, por ter me ajudado com suas palavras de incentivo, amizade e orações.

A Patrícia Sâmea Lêdo Lima Milério e Verônica Pereira de Lima Bertocco, pela disponibilidade em me ajudar no laboratório.

Às amigas Sybilla Torres Dias, Samya Jezini e Alessandra Freitas, por sempre torcerem pela minha vitória.

Aos meus amigos do mestrado: Joyce Meira, por ser praticamente uma irmã e por estar sempre presente nos momentos que precisei; Thiago Mendes, pela ajuda no laboratório, atenção e incentivo; Mateus Souza, pela amizade sincera, por me ouvir e compartilhar as aflições e alegrias ao longo dessa jornada; Catarina Araújo e Maíra Carvalho, por serem um exemplo de determinação e alegria; Glauber Palma, por toda a ajuda e todos os ensinamentos; Samir Noronha, pelo modo tranquilo de lidar com as situações; Danielly Meireles, pela competência e exemplo de dedicação aos estudos; e Alessandra Salino, por toda a ajuda e incentivo no início da minha carreira profissional.

Aos funcionários da Faculdade de Ciências Farmacêuticas e da Faculdade de Odontologia da UFAM, desde a equipe da limpeza, técnicos (Dorotéia, Ronaldo, Diego, Nilton e Lilian) e equipe da segurança, até os professores, por toda a atenção e ajuda nos momentos que precisei.

À FAPEAM pela concessão da bolsa de estudos que contribuiu para a realização da pesquisa.

A todos os amigos do trabalho que me incentivaram a seguir em frente para alcançar meus objetivos.

A cada pessoa que contribuiu direta ou indiretamente para a realização de mais esta etapa da minha vida.

*Sê forte e corajoso, não  
temas nem te espantes,  
porque o Senhor, teu  
Deus, é contigo, por onde  
quer que andares.  
Josué 1:9*



VENÂNCIO GN. Formulação de enxaguatório bucal à base de extrato de *Libidibia ferrea* [Dissertação de Mestrado]. Manaus: Universidade Federal do Amazonas; 2014.

## RESUMO

A utilização da Fitoterapia constitui um método terapêutico que pode ser utilizado para a prevenção e tratamento de doenças bucais, tais como cárie e doença periodontal. Dentre as plantas utilizadas, a *Libidibia ferrea* (*L. ferrea*), conhecida como jucá ou pau ferro, é bastante utilizada na medicina popular por apresentar propriedades terapêuticas anti-inflamatória, analgésica, antimicrobiana e antitérmica. O objetivo deste estudo foi avaliar, *in vitro*, a estabilidade farmacológica de um enxaguatório bucal fitoterápico à base do extrato de *L. ferrea* (228.022- INPA). Para tanto, analisou-se a atividade antimicrobiana da formulação frente a micro-organismos presentes no biofilme dental - *Streptococcus mutans* (ATCC25175), *Streptococcus oralis* (ATCC10557), *Streptococcus salivarius* (ATCC7073), *Lactobacillus casei* (ATCC7469) e *Candida albicans* - (DPUA 1706) pela técnica de microdiluição em caldo, determinando-se a concentração inibitória mínima da formulação; foi realizado o controle de contaminantes do enxaguatório através da determinação do número total de micro-organismos e pesquisa de *Salmonella sp.*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Staphylococcus aureus*; foram analisadas as características de estabilidade (cor, odor, brilho e consistência), a aferição do pH, sedimentação e densidade; avaliou-se a citotoxicidade através do teste de hemólise e cultura de células; foi testado o potencial erosivo através do teste de microdureza (dureza Knoop) e verificou-se a capacidade de manchamento dentário do enxaguatório (espectrofotômetro/ CIE lab). Os resultados obtidos foram tabulados e descritos pela estatística descritiva e quando indicado, através de regressão não-linear, cálculo da média e desvio-padrão (DP), teste de Kolmogorov - Smirnov, teste de Bartlett's, Análise de Variância (ANOVA) e Tukey. O enxaguatório apresentou atividade bactericida frente a todos os micro-organismos testados nas concentrações em 0,55 mg/ mL; 0,6 mg/ mL; 0,65 mg/ mL e 0,25 mg/ mL para o *S. mutans*, *S. oralis*, *S. salivarius* e *L. casei*, respectivamente, e atividade fungicida em 0,25 mg/ mL para a *C. albicans*. Não foram observadas alterações das características organolépticas, sedimentação e microdureza do esmalte dentário. O teste de avaliação de contaminantes mostrou-se ausente para todos os micro-organismos pesquisados. Os valores médios de pH foram de 6,21, 6,15 e 5,85 nos tempos de armazenamento de 0, 30 e 60 dias, respectivamente e de densidade 1,029, 1,035 e 1,033, havendo diferença estatisticamente significativa ao longo do tempo, porém sem interferir na característica final da formulação. O enxaguatório de *L. ferrea* não apresentou atividade hemolítica, porém o veículo causou hemólise com  $CE_{50}$  de 300,5  $\mu$ g/ mL. O teste de Alamar Blue<sup>TM</sup> mostrou que o enxaguatório não causou efeito citotóxico quando em contato com fibroblastos (MRC-5), apresentando valores de  $CI_{50}$  acima de 50  $\mu$ g/ mL, porém causou significativa alteração de cor dos dentes bovinos. Portanto, pode-se concluir que o enxaguatório de *L. ferrea* apresentou condições de estabilidade e qualidade sem contaminantes no produto; atividade bactericida e fungicida frente aos micro-organismos do biofilme dental; não foi citotóxico frente ao teste de hemólise e de cultura de células; não alterou a microdureza do esmalte dentário, porém causou alteração de cor após uso prolongado. Estudos complementares necessitam ser realizados para melhorar as características do enxaguatório quanto à capacidade de alteração de cor e torná-lo viável para uso na clínica diária.

PALAVRAS-CHAVES: *Libidibia ferrea*; enxaguatório bucal; fitoterápicos.

## ABSTRACT

The use of Phytotherapy is a therapeutic method which can be used for the prevention and treatment of dental diseases such as caries and periodontal disease. Among the plants used, *Libidibia ferrea* (*L. ferrea*), known as jucá or iron wood, is widely used in folk medicine by presenting anti-inflammatory, analgesic, antimicrobial and antipyretic therapeutic properties. The aim of this study was to evaluate in vitro pharmacological stability of a mouthwash of *L. ferrea* extract (INPA - 228 022), therefore, analyzed the antimicrobial activity of the formulation against microorganisms present in the biofilm - *Streptococcus mutans* (ATCC 25175), *Streptococcus oralis* (ATCC 10557), *Streptococcus salivarius* (ATCC 7073), *Lactobacillus casei* (ATCC 7469) and *Candida albicans* (DPUA 1706) by microdilution technique, determining the minimum inhibitory concentration of the formulation; it was held the mouthwash contaminants control by determining the total number of microorganisms and *Salmonella* sp, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* and *Staphylococcus aureus*; stability characteristics (color, odor, brightness and consistency) were analyzed, the pH measurement, sedimentation test and density evaluation; cytotoxicity was assessed by hemolysis and cell culture test; it was tested the erosive potential by microhardness test (Knoop hardness) and verified the ability of the mouthwash to induce dental stain (spectrophotometer / CIE lab). The results were tabulated and described by descriptive statistics and when indicated, through non-linear regression, calculating the mean and standard deviation (SD), *Kolmogorov-Smirnov*, *Bartlett* and *Tukey's* tests and Analysis of Variance (ANOVA). The mouthwash presented bactericidal activity against all the organisms tested in the concentrations of 0.55 mg/ mL, 0.6 mg/ mL, 0.65 mg/ mL and 0.25 mg/ mL for *S. mutans*, *S. oralis*, *S. salivarius* and *L. casei*, and fungicidal activity of 0.25 mg/ mL for *C. albicans*. No changes were observed in the organoleptics and sedimentation characteristics such as microhardness of dental enamel. The contaminants test evaluation showed to be absent for all organisms studied. The average pH values were 6.21, 6.15 and 5.85 at 0, 30 and 60 days, respectively, and 1.029, 1.035 and 1.033 g/ L density values, with statistical difference over time, but without interfering with the final characteristic of the formulation. The *L. ferrea* mouthwash showed no hemolytic activity, but the vehicle caused hemolysis with EC<sub>50</sub> of 300.5 mg / mL. The test showed that the Alamar Blue™ mouthwash induced no cytotoxic effect when in fibroblasts (MRC-5) contact, with IC<sub>50</sub> values above 50 mg / mL, but induced significant color change of bovine teeth. Therefore, it can be concluded that the *L. ferrea* mouthwash presented conditions of stability and quality without contaminants; bactericidal and fungicidal activity against microorganisms of the biofilm; it was not cytotoxic by hemolysis and cell culture tests; it did not change the enamel microhardness, however caused color change after prolonged use. Additional studies are needed to improve the mouthwash characteristics in its ability to change color and make it feasible for use in everyday practice.

KEYWORDS: *Libidibia ferrea*, mouthwash, phitotherapics.

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1</b> - A – Árvore de <i>L. ferrea</i> ; B – Frutos (vagens) de <i>L. ferrea</i> .....	50
<b>Figura 2</b> - A – Vagem seca de <i>L. ferrea</i> ; B – Pesagem; C – Decocção; D – Filtragem; E – Balão volumétrico de 1000 mL; F – Aparelho <i>Spray Dryer</i> ; G – Extrato da vagem de <i>L. ferrea</i> .....	51
<b>Figura 3</b> - Enxaguatório de <i>L. ferrea</i> .....	52
<b>Figura 4</b> - Distribuição das substâncias testes na placa .....	56
<b>Figura 5</b> - Peagâmetro .....	57
<b>Figura 6</b> - Centrífuga (Centrifuge 5804R/Eppendorf/AG/Alemanha) .....	58
<b>Figura 7</b> - Picnômetro vazio .....	59
<b>Figura 8</b> - Picnômetro com enxaguatório de <i>L. ferrea</i> .....	59
<b>Figura 9</b> - Esquema para a contagem total de micro-organismos .....	61
<b>Figura 10</b> - Esquema para a pesquisa de <i>Salmonella</i> sp.....	62
<b>Figura 11</b> - Esquema para a pesquisa de <i>E. coli</i> .....	62
<b>Figura 12</b> - Esquema para a pesquisa de <i>S. aureus</i> .....	63
<b>Figura 13</b> - Esquema para a pesquisa de <i>P. aeruginosa</i> .....	63
<b>Figura 14</b> - Centrífuga .....	64
<b>Figura 15</b> - Solução Eritrocitária a 2%.....	64
<b>Figura 16</b> - Diluição das substâncias testes .....	65
<b>Figura 17</b> - Preparo da placa .....	66
<b>Figura 18</b> - Esquema para o ensaio de Alamar Blue / Ahmed (1994).....	68
<b>Figura 19</b> - Esquema do teste de microdureza.....	71
<b>Figura 20</b> - Dentes preparados para colocação na máquina de corte.....	72
<b>Figura 21</b> - Dente bovino posicionado na cortadeira para o seccionamento dentário .....	73
<b>Figura 22</b> - Dente bovino posicionado na cortadeira para o seccionamento dentário .....	73
<b>Figura 23</b> - Selamento coronário com resina composta.....	73
<b>Figura 24</b> - Aparelho Vita EasyShade® Compact .....	74
<b>Figura 25</b> - Grupos I, II, III, IV e V posicionados no agitador Certomat® MO.....	75
<b>Figura 26</b> - CIM bactericida do enxaguatório de <i>L. ferrea</i> no poço A5 e CIM bacteriostática no poço A10 frente ao <i>S. mutans</i> .....	81
<b>Figura 27</b> - Plaqueamento das linhas A1 a A6 da microdiluição do enxaguatório de <i>L.</i> <i>ferrea</i> frente ao <i>S. mutans</i> .....	81
<b>Figura 28</b> - CIM bactericida do enxaguatório de <i>L. ferrea</i> no poço A4 e CIM bacteriostática no poço A10 frente ao <i>S. oralis</i> .....	81
<b>Figura 29</b> - Plaqueamento das linhas A1 a A6 da microdiluição do enxaguatório de <i>L.</i> <i>ferrea</i> frente ao <i>S. oralis</i> .....	82

<b>Figura 30</b> - CIM bactericida do enxaguatório de <i>L. ferrea</i> no poço A3 e CIM bacteriostática no poço A10 frente ao <i>S. salivarius</i> .....	82
<b>Figura 31</b> - Plaqueamento das linhas A1 a A6 da microdiluição do enxaguatório de <i>L. ferrea</i> frente ao <i>S. salivarius</i> .....	82
<b>Figura 32</b> - CIM bactericida do enxaguatório de <i>L. ferrea</i> no poço A11 frente ao <i>L. casei</i> .....	83
<b>Figura 33</b> - Plaqueamento das linhas A1 a A12 da microdiluição do enxaguatório de <i>L. ferrea</i> frente ao <i>L. casei</i> .....	83
<b>Figura 34</b> - CIM fungicida do enxaguatório de <i>L. ferrea</i> no poço A11 frente à <i>C.albicans</i> .....	83
<b>Figura 35</b> - Plaqueamento das linhas A1 a A12 da microdiluição do enxaguatório de <i>L. ferrea</i> frente à <i>C. albicans</i> .....	84
<b>Figura 36</b> - Tubos falcon contendo o enxaguatório de <i>L. ferrea</i> após teste de sedimentação nos tempos experimentais de 0,30 e 60 dias .....	88
<b>Figura 37</b> - Avaliação microbiológica para a contagem total de micro-organismos .....	92
<b>Figura 38</b> - Avaliação microbiológica para a pesquisa de <i>Salmonella</i> sp.....	92
<b>Figura 39</b> - Pesquisa de <i>E. coli</i> .....	93
<b>Figura 40</b> - Pesquisa de <i>S. aureus</i> .....	93
<b>Figura 41</b> - Pesquisa de <i>P. aeruginosa</i> .....	93
<b>Figura 42</b> - Teste de hemólise.....	95
<b>Figura 43</b> - Grupos I, II, III, IV e V após teste de alteração de cor .....	99
<b>Figura 44</b> - Visão aproximada dos corpos de prova 11 (GIII - enxaguatório) e 16 (GIV - extrato) após 24 horas de imersão nas soluções .....	99
<b>Figura 45</b> - Visão aproximada dos corpos de prova 11 (GIII - enxaguatório) e 16 (GIV - extrato) após 24 horas de imersão nas soluções .....	99

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1</b> - Componentes utilizados para a formulação de 20 mL do enxaguatório de <i>L. ferrea</i> .....	52
<b>Tabela 2</b> - Valores referentes ao volume em $\mu\text{L}$ da placa de microdiluição .....	55
<b>Tabela 3</b> - Valores referentes à Concentração Final em mg/mL em cada poço da placa de microdiluição .....	55
<b>Tabela 4</b> - Valores da CIM (mg/mL) bactericida das substâncias testadas frente aos micro-organismos .....	80
<b>Tabela 5</b> - Valores da CIM (mg/mL) bacteriostática das substâncias testadas frente aos micro-organismos.....	80
<b>Tabela 6</b> - Distribuição segundo a média do pH e da densidade do enxaguatório de <i>L. ferrea</i> nos tempos (0, 30 e 60 dias). .....	89
<b>Tabela 7</b> - Resultados do Teste de hemólise após análise estatística da $CE_{50}$ ( $\mu\text{g}/\text{mL}$ )...95	
<b>Tabela 8</b> - Resultados do Teste de citotoxicidade pelo Alamar Blue™ .....	96
<b>Tabela 9</b> - Distribuição segundo a média da dureza inicial, final e % PDS (Perda de Dureza Superficial) em relação aos diferentes grupos .....	98
<b>Tabela 10</b> - Distribuição segundo a média do $\Delta\text{L}$ dos grupos .....	100
<b>Tabela 11</b> - Distribuição segundo a média do $\Delta\text{a}$ dos grupos .....	101
<b>Tabela 12</b> - Distribuição segundo a média do $\Delta\text{b}$ dos grupos .....	102

## LISTA DE GRÁFICOS

<b>Gráfico 1</b> - Distribuição segundo a média do pH do enxaguatório de <i>L. ferrea</i> nos tempos (0, 30 e 60 dias) .....	89
<b>Gráfico 2</b> - Distribuição segundo a média da Densidade (g/ L) do enxaguatório de <i>L. ferrea</i> nos tempos (0, 30 e 60 dias) .....	91
<b>Gráfico 3</b> - Distribuição segundo a média do $\Delta E$ (Variação de cor) dos diferentes grupos .....	102

## LISTA DE SIGLAS, SÍMBOLOS E ABREVIATURAS

**°C:** graus Celsius  
**%:** Porcentagem  
**Ø:** Diâmetro  
**Kg:** quilogramas  
**g:** gramas  
**g:** força g  
**h:** horas  
**min:** minutos  
**s:** segundos  
**H:** Hidrogênio  
**µL:** microlitros  
**µm:** micrômetros  
**ATCC:** American Type Culture Collection  
**PVM/MA:** Polivinil de metila e éter copolímero de anidrido maleico  
**EP:** extrato puro  
**et al:** e outros (abrev. de “ et alli”)  
**mg:** miligramas  
**mL:** mililitros  
**mm:** milímetros  
**rpm:** rotação por minuto  
**UFC:** unidade formadora de colônias  
**ATP:** Adenosina trifosfato  
**CIM:** Concentração inibitória mínima  
**CBM:** Concentração bactericida mínima  
**CIMA:** Concentração inibitória mínima de aderência  
**NaOH:** Hidróxido de sódio  
**DMSO:** Dimetilsulfóxido  
**IC:** Índice de citotoxicidade  
**CLAE:** Cromatografia Líquida de Alta Especificidade  
**INPA:** Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia  
**DPUA:** Departamento de Parasitologia da Universidade Federal do Amazonas  
**CEEA:** Comitê de Ética em Experimentação Animal  
**MVE:** Microscopia eletrônica de varredura  
**OMS:** Organização Mundial da Saúde  
**PAE:** Película adquirida de esmalte  
**PIC:** Polissacarídeos intracelulares  
**PEC:** Polissacarídeos extracelulares  
**RDC:** Resolução Diretiva Colegiada  
**rpm:** rotação por minuto  
**S. aureus:** *Staphylococcus aureus*  
**P. aeruginosa:** *Pseudomonas aeruginosa*  
**E. coli:** *Escherichia coli*  
**E. faecalis:** *Enterococcus faecalis*  
**C. albicans:** *Candida albicans*  
**L. casei:** *Lactobacillus casei*  
**S. mutans:** *Streptococcus mutans*  
**S. oralis:** *Streptococcus oralis*  
**S. salivarius:** *Streptococcus salivarius*  
**S. mitis:** *Streptococcus mitis*

## SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	16
2. REVISÃO DE LITERATURA.....	20
2.1 Cárie, Doença Periodontal.....	20
2.2 Plantas medicinais e Fitoterapia.....	24
2.3 <i>Libidibia ferrea</i> .....	31
2.4 Enxaguatórios bucais.....	36
2.5 Erosão dentária e Alteração de cor.....	44
3. OBJETIVOS.....	49
4. MATERIAIS E MÉTODOS.....	50
4.1 Obtenção da matéria-prima vegetal.....	50
4.2 Preparação do extrato.....	50
4.3 Formulação do enxaguatório bucal.....	52
4.4 Avaliação da CIM do enxaguatório de <i>Libidibia ferrea</i> .....	53
4.4.1 Micro-organismos testes e preparação dos inóculos.....	53
4.4.2 Determinação da atividade antimicrobiana do enxaguatório de <i>Libidibia ferrea</i> .....	54
4.5 Caracterização da formulação.....	57
4.5.1 Aferição do pH.....	57
4.5.2 Teste de sedimentação.....	57
4.5.3 Determinação da densidade do enxaguatório de <i>L. ferrea</i> .....	58
4.5.4 Estudo da estabilidade do enxaguatório.....	59
4.5.5 Avaliação microbiológica para a pesquisa de contaminantes do enxaguatório de <i>Libidibia ferrea</i> .....	60
4.6 Teste de hemólise.....	64
4.7 Cultura de células.....	67
4.8 Avaliação da microdureza do esmalte dentário.....	68
4.9 Avaliação da alteração de cor do esmalte dentário.....	72
4.10 Análise Estatística.....	76
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	78
6. CONCLUSÃO.....	106
REFERÊNCIAS.....	107



## 1. INTRODUÇÃO

A cárie e a doença periodontal são os dois maiores problemas de saúde em Odontologia, tendo como principal fator etiológico o acúmulo de biofilme dental (BORGHI, MOIMAZ e SALIBA, 2005).

O biofilme dental pode ser definido como uma massa densa, não calcificada, constituída por micro-organismos envolvidos numa matriz rica em polissacarídeos extracelulares bacterianos e glicoproteínas salivares, firmemente aderida aos dentes, cálculos e outras superfícies da cavidade bucal (LASCALA, 1997; MARINHO e ARAÚJO, 2007).

Além da frequência de ingestão de carboidratos, a concentração de bactérias, a presença de saliva, a capacidade tampão e a duração dos efeitos são, em associação, fatores determinantes para o estabelecimento e a formação do biofilme (THYLSTRUP e FEJERSKOV, 2001).

A cárie dentária é uma doença infecciosa que evolui de forma lenta na maioria dos indivíduos e, na ausência de tratamento, progride até destruir totalmente a estrutura dentária, sendo resultante do desequilíbrio nos processos de desmineralização e remineralização (FEJERSKOV e KIDD, 2005).

A doença periodontal é uma infecção crônica caracterizada por processo inflamatório destrutivo do tecido de suporte dos dentes (BENSO e OTUKI, 2012), sendo a gengivite a de maior prevalência dentre os brasileiros, atingindo mais de 90% da população, caracterizando-se por uma inflamação reversível da gengiva marginal decorrente do acúmulo do biofilme dental (RODRIGUES et al, 2009).

O controle do biofilme e das patologias decorrentes da sua presença pode ser realizado através de procedimentos mecânicos, químicos ou através da dieta. O controle mecânico representa o método mais valioso para a prevenção e remoção do biofilme, mas nem sempre é realizado adequadamente. Desse modo, substâncias antimicrobianas vêm sendo utilizadas para o controle químico do biofilme dental, como forma complementar aos procedimentos mecânicos ou para afecções específicas (BUGNO et al, 2006; MOREIRA et al, 2008).

Existem vários veículos para a liberação dos agentes antimicrobianos na cavidade bucal. O veículo ideal deve reunir características como a sua compatibilidade com o agente ativo, uma adequada biodisponibilidade no local de ação, além de uma boa aceitação por parte do paciente (THYLSTRUP e FEJERSKOV, 1995). Um dos veículos são os dentifrícios e os colutórios, sendo este último uma mistura de componentes ativos, água, álcool, surfactantes, umectantes e flavorizantes (TORRES et al, 2000).

Vários são os produtos vendidos como antissépticos bucais, geralmente apresentando associações de substâncias ativas em sua formulação como cloreto de cetilperidínio e fluoreto de sódio; triclosan, copolímero PVM/MA (Polivinil de metila e éter copolímero de anidrido maleico) e fluoreto de sódio; triclosan, copolímero PVM/MA, cloreto de cetilperidínio e fluoreto de sódio; digluconato de clorexidina e fluoreto de sódio (ZANIN et al, 2007).

A clorexidina está entre os antissépticos bucais mais utilizados, sendo uma bisguanidina catiônica que apresenta alta substantividade e amplo espectro de ação sobre bactérias Gram positivas, leveduras e dermatófitos (BUGNO et al, 2006; MARINHO e ARAÚJO, 2007). Porém apresenta efeitos

adversos locais quando utilizada por tempo prolongado (MORAN et al, 1992), tais como manchas nos dentes, alteração no paladar e aumento da formação de biofilme supragengival (FLOTRA et al, 1971). Desta forma, seu uso limita-se a situações onde a higiene bucal mecânica esteja comprometida (ADDY, 1986).

A busca por medidas cada vez mais simples, de menor custo para a higienização bucal e que possam minimizar o aparecimento de efeitos colaterais locais, levou ao uso de enxaguatórios bucais à base de substâncias químicas naturais, como os fitoterápicos, que possuem efeitos satisfatórios, mostrando-se como uma alternativa interessante, contribuindo para melhorar o acesso da população aos cuidados com a prevenção e tratamento de doenças bucais (BORGHI, MOIMAZ e SALIBA, 2005; MARINHO e ARAÚJO, 2007; MORAN, ADDY e ROBERTS, 1992).

A Fitoterapia insere-se como uma prática terapêutica com possibilidade de atuar no controle do biofilme dental e, conseqüentemente, como agente preventivo no desenvolvimento de patologias bucais como estabelecido na portaria 971 de 3 de Maio de 2006, na qual o Ministério da Saúde aprovou a Política Nacional de Práticas Integrativas e Complementares (Acupuntura, Fitoterapia, Hipnose, Homeopatia e Laserterapia) no Sistema Único de Saúde, tornando a Fitoterapia um incentivo ao desenvolvimento comunitário, à solidariedade e à participação social, favorecendo a recomendação da adoção pelas Secretarias de Saúde dos Estados, do Distrito Federal e dos Municípios da implantação e implementação das ações e serviços relativos às práticas integrativas e complementares. Com base nessa portaria o Conselho Federal de Odontologia, na Resolução Colegiada Diretiva (RDC) 82/2008, reconheceu

e regulamentou o uso pelo cirurgião-dentista de tais práticas integrativas e complementares à saúde bucal.

Dentre as plantas utilizadas em Odontologia, a *Libidibia ferrea* (*L. ferrea*), conhecida como jucá ou pau de ferro, é bastante utilizada na medicina popular por apresentar propriedades terapêuticas anti-inflamatória, analgésica e antimicrobiana, o que justifica o grande interesse de pesquisadores por esta planta (CAVALHEIRO et al, 2009; PEREIRA et al, 2012; SAMPAIO et al, 2009).

A *L. ferrea* tem demonstrado grande potencial, havendo uma perspectiva do seu uso como enxaguatório bucal para o controle do biofilme dental, por possuir atividade antibacteriana frente a diversos micro-organismos presentes na cavidade bucal (MARREIRO, 2011; MARREIRO et al, 2014).

No entanto, para o aprimoramento de novos produtos utilizados em Odontologia e para a comprovação de sua eficácia, os mesmos necessitam ser submetidos a diversos testes, procurando visualizar o seu desempenho clínico quando da utilização na cavidade bucal, para viabilizar o uso do produto na clínica diária (DONASSOLO et al, 2007; EVANGELISTA et al, 2013), pois compostos das plantas podem ser tóxicos, alterar a rugosidade da superfície dentária, bem como causar manchamentos.

Desta forma, o presente trabalho justifica-se como forma de utilizar a Fitoterapia como prática terapêutica em Odontologia através do aprimoramento de uma formulação de um enxaguatório bucal à base de extrato de *Libidibia ferrea*, pois as soluções fitoterápicas são mais acessíveis e com amplo benefício farmacológico quando bem empregadas.

## **2. REVISÃO DE LITERATURA**

### **2.1 Cárie e Doença Periodontal**

Os biofilmes que colonizam as superfícies dentárias e os tecidos orais podem provocar cáries, gengivites e periodontites, que estão entre as infecções bucais mais comuns dentre os problemas de saúde pública em Odontologia (NUNES et al, 2007).

A atividade do biofilme é articulada por fatores tais como a dieta, a saliva, a presença de fluoreto, a higiene oral, a superfície dental e o tempo de contato entre esta e o biofilme (MARSH, 1995; KIDD e FEJERSKOV, 2011).

A cárie dentária é considerada como manifestação clínica de uma infecção bacteriana, cuja atividade metabólica das bactérias resulta em um contínuo processo de desmineralização e remineralização do tecido dentário. O desequilíbrio nesse processo pode causar uma progressão da desmineralização do dente com consequente formação da lesão cariosa (MARSH, 1995; THYLSTRUP e FEJERSKOV, 2001).

No Brasil, dados epidemiológicos oficiais mostrados nos documentos SB Brasil – Condição de Saúde Bucal na População Brasileira (BRASIL, 2003; BRASIL, 2011) revelaram que as metas da Organização Mundial de Saúde (OMS) não foram alcançadas em nenhuma das macrorregiões brasileiras no início das duas décadas referidas, refletindo a necessidade de melhorar os programas de atenção básica e as investigações sobre prevenção e controle da cárie dentária.

O caráter multifatorial da doença cárie possibilita a atuação de modo a prevenir ou retardar a velocidade do processo cariioso. Além dos fatores condicionantes, tais como socioeconômicos e culturais, têm-se os fatores moduladores, tais como: composição salivar, nível de higiene bucal, espessura do biofilme e presença ou ausência do flúor no ecossistema deste biofilme, que se somam à presença de micro-organismos cariogênicos e dieta rica em carboidratos fermentáveis (ANDREOLLI e LARA, 2004).

Em condições de saúde, após a ingestão de sacarose, o pH do biofilme dental cai, mas a saliva é capaz de tamponar o meio. Em pH menor que 5,5, a saliva fica subsaturada em relação aos componentes da hidroxiapatita (íons cálcio e fosfato) e, então, o esmalte começa a ceder íons para o meio a fim de restabelecer o equilíbrio. Assim que o pH se restabelece, a saliva fica novamente supersaturada desses íons e passa a fornecê-los para o esmalte. Esse processo de alternância equilibrada entre perda e ganho de mineral pela estrutura dentária é chamado processo de desmineralização/ remineralização (processo des-re) (FEJERSKOV e KIDD, 2005; SILVA et al, 2008).

Quanto à doença periodontal, esta ocorre devido a um desequilíbrio entre as ações de agressão e defesa sobre os tecidos de sustentação e proteção do dente, que tem como principal determinante o biofilme dental, a partir das diferentes respostas dadas pelo hospedeiro. É entendida como uma doença infecciosa, onde as alterações de forma e função são consideradas sinais. A normalidade do periodonto é definida por variáveis biológicas, que são mais coerentes com a etiopatogenia da doença e permitem que usuários que em algum momento foram portadores da doença e apresentem sequelas (como recessão e mobilidade), retornem ao estado de saúde (BRASIL, 2008).

Inicialmente ocorre um desequilíbrio entre bactérias e defesas do hospedeiro que leva a alterações vasculares e à formação de exsudado inflamatório. Esta fase manifesta-se clinicamente com alteração da cor da gengiva, hemorragia e edema, sendo uma situação reversível se a causa for eliminada. Esta situação, definida como Gengivite, promove a fragilização das estruturas, o que possibilita um maior acesso dos agentes bacterianos agressores e/ou seus produtos às áreas subjacentes, podendo resultar na formação de bolsas periodontais, com perda óssea e uma contínua migração apical do epitélio, oferecendo menos resistência aos agentes agressores, o que perpetua o processo inflamatório, culminando com a destruição dos componentes do periodonto, ou seja, cemento radicular, ligamento periodontal e osso alveolar (KALDAHAL et al, 1996; ALMEIDA et al, 2006).

O controle do biofilme pode ser realizado através de procedimentos mecânicos, químicos ou através da dieta. O controle mecânico representa o método mais eficaz, mas nem sempre é realizado adequadamente. Desse modo, substâncias antimicrobianas vêm sendo utilizadas para o controle químico do biofilme dental, como auxiliares aos procedimentos mecânicos ou para afecções específicas (BUGNO et al, 2006; FEJERSKOV e KIDD, 2005; MOREIRA et al, 2008).

Teixeira, Bueno e Cortés (2010) realizaram um estudo com o objetivo de escrever os fenômenos físico-químicos no interior do biofilme que envolvem a formação e o desenvolvimento do biofilme dental e como este pode interferir na formação da cárie dentária, concluindo que o processo de formação do biofilme bacteriano oral é complexo devido ao grande número de fatores físicos, químicos e biológicos interagindo de forma contínua e organizada. Em

função disso, a atividade dos antimicrobianos usados como agente antibiofilme é limitada às fases iniciais de sua formação, quando o nível de complexidade desse sistema ainda é baixo.

Medidas terapêuticas capazes de combater o biofilme dental, tanto curativamente, como preventivamente têm um impacto bastante positivo sobre a prevenção de cárie e doença periodontal. Neste contexto, como as bactérias presentes no biofilme dental exibem cada vez maior resistência e tolerância aos agentes antimicrobianos, decorrente do uso indiscriminado de antibióticos, incluindo os utilizados em dentifrícios e enxaguatórios bucais, observa-se um interesse global no aproveitamento da biodiversidade, particularmente das espécies vegetais, que vêm sendo utilizadas em várias áreas da saúde. Portanto, a procura pela descoberta de agentes antimicrobianos, oriundos de substâncias naturais pode levar ao desenvolvimento de novos fármacos importantes na Odontologia (ANIBAL, 2007; CORDEIRO et al, 2006; MARSH, MOTER e DEVINE, 2011).

Diante do desenvolvimento de resistência aos antimicrobianos, existe uma grande preocupação relacionada a qual tipo de tratamento utilizar no combate às infecções provocadas por micro-organismos. O emprego de extratos brutos de plantas tem merecido a atenção de pesquisadores de vários países, já que podem inibir o crescimento bacteriano e fúngico por diferentes mecanismos quando comparados aos antimicrobianos (ANIBAL, 2007).



## 2.2 Plantas medicinais e Fitoterapia

O Brasil é considerado o mais rico entre os países de megadiversidade, detendo aproximadamente 20% do número total de espécies do planeta, a grande maioria delas ainda não estudada convenientemente. Estima-se que no máximo 15% das espécies vegetais existentes no mundo tenham sido sistematicamente estudadas com relação ao aproveitamento delas como recurso terapêutico e este percentual é menor ainda se considerarmos espécies nativas brasileiras (TAKEMURA, 2008).

Embora vários produtos antimicrobianos estejam comercialmente disponíveis, esses agentes químicos podem alterar a microbiota bucal além de terem efeitos colaterais indesejáveis, tais como diarreia, vômitos e manchas nos dentes. Assim, a utilização de produtos naturais a partir de plantas medicinais, torna-se uma opção importante (PALOMBO, 2011).

A utilização da Fitoterapia é um método complementar para a prevenção e tratamento de doenças bucais, através do uso de plantas medicinais, tendo um vasto aproveitamento pela população local e amplo uso na medicina moderna, atraindo pesquisadores de diversas áreas. Os fitoterápicos utilizados na prática Odontológica têm mostrado resultados efetivos sobre o controle da formação do biofilme dental, podendo interferir na síntese de polissacarídeos (ROSA, MAIA e GALLO, 2010; SANTOS et al, 2010).

Em 2005, a Secretaria de Ciência Tecnologia e Insumos Estratégicos, por meio do Departamento de Assistência Farmacêutica e Insumos Estratégicos (DAF/SCTIE/MS) construiu em parceria com outros ministérios e com a colaboração de consultores e pesquisadores, uma lista com espécies

vegetais considerando as já utilizadas nos serviços de saúde estaduais e municipais, o conhecimento tradicional e popular e os estudos químicos e farmacológicos disponíveis. Esse documento subsidiou, em 2008, a construção da RENISUS, que é constituída por plantas medicinais que interessam ao SUS por serem nativas ou exóticas adaptadas, amplamente utilizadas pela população brasileira, e já terem algumas evidências para indicação de uso na atenção básica de saúde. No entanto, precisam de estudos para: confirmar segurança e eficácia, definição da indicação de uso e da forma farmacêutica mais adequada, a possibilidade de cultivo e produção (BRASIL, 2006; BRASIL, 2008).

São inúmeros os trabalhos desenvolvidos sobre plantas, que comprovam suas ações terapêuticas e descobertas de novos compostos que podem dar origem a novos medicamentos fitoterápicos (BANDEIRA et al, 1999; COWAN, 1999; FARIA JÚNIOR, 2005; CONDE, 2006; SOARES et al, 2006; SAMPAIO et al, 2009; FREIRES et al, 2010; PALOMBO, 2011; PIERI et al, 2012; GODOI, 2013; MARREIRO et al, 2014), porém existem critérios para o registro de novos medicamentos fitoterápicos. Isto é realizado pela ANVISA (Agência Nacional de Vigilância Sanitária), que faz este controle através da RDC 13/2013 de 15 de março de 2013. Com essa medida, a portaria visa a aprovação de regulamento técnico sobre registro de medicamentos fitoterápicos junto ao sistema de vigilância sanitária.

No intuito de estabelecer as diretrizes para a atuação do governo na área de plantas medicinais e fitoterápicos, elaborou-se a Política Nacional de Plantas Mediciniais e Fitoterápicos, que se constitui parte essencial das políticas públicas de saúde, meio ambiente, desenvolvimento econômico e

social como um dos elementos fundamentais de transversalidade na implementação de ações capazes de promover melhorias na qualidade de vida da população brasileira (BRASIL, 2006).

Soares et al (2006) afirmaram que o Brasil dispõe de uma diversidade de substâncias naturais com propriedades terapêuticas bastante difundidas dentro da Odontologia Preventiva. Dentre as substâncias naturais com uso na Odontologia, destacam-se o jucá, a aroeira, o gengibre, a alfavaca, a romã e a hortelã da folha graúda, que devido às suas propriedades terapêuticas, possuem uso bastante difundido dentro da medicina popular no tratamento de diversas afecções bucais.

Desta maneira, pode-se conceituar fitoterápico como sendo um produto obtido a partir de planta medicinal, ou de seus derivados, exceto substâncias isoladas, com finalidade profilática, curativa ou paliativa. A grande maioria dos medicamentos, hoje disponíveis no mundo, é ou foi originado de estudos desenvolvidos a partir da cultura popular que fazem da rica biodiversidade brasileira um vasto campo de pesquisa científica (BRASIL, 2011).

As substâncias químicas consideradas como princípios ativos encontrados nos vegetais são, na maioria, provenientes do metabolismo secundário tendo uma função ligada ao relacionamento da planta com o ambiente que a envolve (MAIA, 2008).

Os compostos oriundos do metabolismo secundário são os responsáveis pelos efeitos medicinais ou tóxicos das plantas e apresentam grande importância ecológica, pois representam uma defesa química contra insetos e micro-organismos ou podem interferir em processos simbióticos (MAZID et al, 2011).

A utilização de plantas medicinais ocorre devido à presença desses metabólitos especiais e, devido a sua ampla utilização terapêutica, têm sido pesquisados para comprovação científica de segurança e eficácia. A análise primária para verificação do uso terapêutico de uma planta se faz através da triagem dos compostos químicos com potencial efeito no ser humano (VIANA, SANTANA e MOURA, 2012).

Está bem estabelecido que muitos metabólitos produzidos pelas plantas, tais como taninos, terpenóides, alcalóides e flavonóides, proporcionam nova fonte de substâncias antimicrobianas, possibilitando o desenvolvimento de novas drogas com efeito sobre patógenos resistentes (AGRWALA e YADAV, 2011; AHMAD e BEG, 2001; COWAN, 1999).

Os medicamentos fitoterápicos devem ser considerados com o mesmo rigor que os medicamentos sintéticos. A fiscalização e a obediência às instruções normativas devem ocorrer nas etapas de extração, de processamento, de conservação e do armazenamento, de modo, a evitar contaminação microbiana com conseqüente perda das suas propriedades, diminuindo com isso os riscos a pacientes ou consumidores desses produtos (EVANGELISTA et al, 2013; SOUZA e MACIEL, 2010).

O controle de qualidade engloba uma série de ensaios e testes que vão desde a identificação botânica da planta até o doseamento dos princípios ativos, passando por análises microbiológicas, onde se analisa a contaminação por micro-organismos (bactérias e fungos) que podem provocar diversos prejuízos à saúde do consumidor. Esses ensaios estão descritos no documento da OMS (Organização Mundial de Saúde), como relevantes e imprescindíveis na análise da qualidade das plantas medicinais, sendo assim, exigidos para a

certificação de matérias-primas vegetais e registro de produtos derivados (BRASIL, 2010).

A necessidade do controle microbiológico é importante para garantir a segurança, eficácia e aceitabilidade desses produtos. A falha nas medidas preventivas e de controle do processo de fabricação pode levar ao comprometimento do desempenho do produto devido à quebra da estabilidade da formulação, à alteração das características físicas (cor, viscosidade) e químicas (inativação do princípio ativo), podendo resultar em graves consequências à saúde do consumidor (NASCIMENTO et al, 2005; SIMÕES et al, 2004; YAMAMOTO et al, 2004).

No processo de avaliação e validação de um produto é necessário comprovar os benefícios de seu uso, sua efetividade como medicamento e seus riscos à saúde humana, dos animais e do ambiente. Portanto, é fundamental a realização de ensaios toxicológicos para avaliar a segurança e o risco/benefício do possível uso terapêutico deste novo produto (EVANS, 2009; NÓBREGA et al, 2008).

Soares et al (2006) avaliaram a atividade antibacteriana das tinturas de jucá, aroeira, gengibre, alfavaca, própolis, romã e hortelã da folha graúda, sobre as cepas de *S. aureus* (ATCC 25923), *S. mutans* (ATCC 2575), *S. sobrinus* (ATCC 27609), *S. mitis* (ATCC 9811), *S. sanguis* (ATCC 10557) e *L. casei* (ATCC 7469), utilizando-se a clorexidina 0,12% como controle positivo. Determinou-se a diluição inibitória máxima (DIM) em meio de cultura Ágar Mueller Hinton, das tinturas nas formas pura (1:0) e diluídas de 1:1 até 1:32. Observou-se susceptibilidade variada das bactérias, sendo o *S. aureus* o micro-organismo mais sensível. Dentre as tinturas, o jucá, a aroeira e a própolis

apresentaram uma significativa atividade antibacteriana sobre *S. mutans*, *S. sobrinus*, *S. mitis*, *S. sanguis* e *L. casei*, sendo que o gengibre e a alfavaca apresentaram os menores espectros de ação frente às cepas bacterianas avaliadas.

Freires et al (2010) avaliaram, *in vitro*, as atividades antibacteriana e antiaderente das tinturas de *Schinus terebinthifolius* (Aroeira) e *Solidago microglossa* (Arnica) frente a *S. mutans* e *L. casei*. A atividade antibacteriana foi determinada pela CIM do crescimento bacteriano através da microdiluição e a atividade antiaderente foi estabelecida pela CIMA (Concentração Inibitória Mínima de Aderência) da bactéria a tubos de vidro, na presença de sacarose a 5%. As linhagens bacterianas mostraram-se susceptíveis à ação das tinturas avaliadas. Em relação à CIM, observaram-se valores mais expressivos dos produtos sobre o *L. casei*, apresentando a Aroeira a menor CIM (1,562 mg/mL). Em relação à CIMA, pôde-se perceber que a Aroeira apresentou resultados mais satisfatórios frente a *S. mutans*, pois foi capaz de inibir a aderência bacteriana ao vidro, estando em uma menor concentração (0,892 mg/mL).

Pieri et al (2012) realizaram um estudo para avaliar a atividade do óleo de copaíba (*Copaifera officinalis*) contra o *S. mutans*, através da determinação da CIM pela técnica de diluição em caldo, tendo-se um controle negativo, um controle positivo (clorexidina a 0,12%) e uma solução a 10% de óleo de copaíba como teste, onde os resultados mostraram que o óleo de copaíba mostrou uma atividade bacteriostática contra o *S. mutans* em todas as concentrações testadas até 0,78 µL/mL, podendo ser utilizado contra bactérias cariogênicas na prevenção da cárie.

Smullen et al (2012) afirmaram que há comprovação científica de que extratos de plantas podem inibir a formação de biofilme dental. Desta forma, realizaram uma pesquisa para avaliar a capacidade de extratos de *Rosmarinus officianalis* L., *Salvia officianalis* L., cacau fermentado, de semente de uva vermelha e chá verde para inibir o biofilme bacteriano, a atividade da glicosiltransferase, a produção de glucano e a formação do biofilme em um modelo *in vitro* utilizando dentes bovinos. A atividade antimicrobiana de extratos vegetais contra bactérias orais foi determinada utilizando o método de difusão em ágar. Investigou-se a inibição de crescimento e produção de ácido a partir de glicose e sacarose pelo *S. mutans* em cultura líquida. Os extratos das plantas inibiram o crescimento de bactérias bucais e impediram a produção de ácido por *S. mutans*. Os extratos inibiram a atividade da glicosiltransferase e a produção de glucano, além de inibir a adesão ao vidro, reduzindo o crescimento do biofilme bacteriano em mais de 80% a uma concentração de 0,25 mg/mL<sup>-1</sup>. O extrato de chá verde inibiu completamente a formação do biofilme, mas resultou em uma mancha esverdeada dos dentes que não pode ser removido por lavagem. Os resultados sugerem que os extratos *Rosmarinus officianalis* L. e *Salvia officianalis* L. podem ser úteis como agentes antibiofilme, em alimentos e preparações dentais. Dentes bovinos podem ser usados como uma alternativa à hidroxiapatita para estudos de formação do biofilme, mas eles precisam ser cuidadosamente esterilizados antes da utilização.

Os produtos à base de plantas medicinais são meios complementares muito interessantes do ponto de vista econômico, facilitando o acesso da população a terapias alternativas que possam efetivamente controlar o crescimento do biofilme bacteriano e, conseqüentemente, auxiliar no combate à

çárie, à doença periodontal ou ainda como desinfetantes de próteses (BUSSADORI, 2013; GODOI, 2013).

### **2.3. *Libidibia ferrea***

Dentre as plantas utilizadas em Odontologia, a *Libidibia ferrea*, ex *Caesalpinia ferrea* L., conhecida como jucá ou pau de ferro, é uma espécie da família *Leguminosae* que pode ser encontrada nas regiões Norte e Nordeste e também no estado do Rio de Janeiro. É bastante utilizada na medicina popular por apresentar propriedades terapêuticas anti-inflamatória, analgésica, antimicrobiana e antitérmica, o que justifica o grande interesse de pesquisadores por esta planta (CAVALHEIRO et al, 2009; PEREIRA et al, 2012; SAMPAIO et al, 2009).

O nome *Caesalpinia* é em homenagem ao botânico italiano, Andréa Caesalpinio e jucá vem da palavra indígena yuca, que significa matar, pois com ela os índios karirishoko faziam seus tacapes (MAIA, 2004; SANTOS, 2011, VIANA et al, 2011).

*L. ferrea* é uma espécie arbórea distribuída por toda a região tropical do Brasil. É popularmente conhecida como pau-ferro ou jucá e tem importância econômica, principalmente na indústria de fármacos e na construção civil. Sua casca é muito usada na medicina popular, tendo propriedades anti-inflamatórias e analgésicas, anticancerígenas e antiúlcera (GALDINO, MESQUITA e FERRAZ, 2007). O extrato hidroalcoólico dos frutos de *L. ferrea* tem ação anti-inflamatória, imuno estimulante, hiperglicemiante e inibitória de tumores (LORENZI, 2008; SANTOS, 2011).



Com relação ao perfil fitoquímico, estudos preliminares do extrato hidroetanólico das folhas e da casca do caule do jucá demonstraram a presença de flavonóides, saponinas, taninos, cumarinas, esteróides e substâncias fenólicas (GONZÁLES et al, 2004). Enquanto o extrato aquoso dos frutos do jucá foi caracterizado contendo alcalóides, antraquinonas, açúcares, flavonóides, taninos, saponinas, sesquiterpenos, lactonas e triterpenos. Destes, os taninos são os compostos majoritários do extrato (BALBACH, 1992; CARVALHO, 1993). Dentre os constituintes químicos destacam-se a presença de polifenóis, onde o ácido gálico e o ácido elágico podem ser as possíveis substâncias responsáveis por parte da atividade biológica e terapêutica dos frutos da planta (UEDA et al, 2004).

Os taninos são comumente divididos em hidrolisáveis e condensados, em função da sua estrutura química (BEELEN et al, 2008). Os taninos hidrolisáveis são polímeros de ácido gálico (galotaninos) ou ácido hexahidroxidifênico (elargitaninos). O ácido gálico está amplamente distribuído em várias plantas, frutas e comidas, possuindo atividades farmacológicas, tais como: antibacteriana, antimelanogênica, antiviral e anti-inflamatória além da atividade anticâncer contra vários tipos de células (MAURYA, NANDAKUMAR e DEVASAGAYAM, 2011). O ácido elágico é um composto com propriedades antioxidantes, antiproliferativas, quimiopreventivas e antiaterogênicas, exercendo efeito através da ativação da várias vias de sinalização, incluindo a apoptose, proteção contra dano oxidativo ao DNA, ou oxidação-LDL e a alteração da expressão do fator de crescimento (PAPOUTSI et al, 2005).

Muitos representantes dos taninos apresentaram propriedades antivirais, antibacterianas e antitumorais, sendo capazes inclusive, de inibir seletivamente

a replicação do HIV (KHANBABAEE e REE, 2001). Além disso, os taninos possuem atividade antisséptica que pode ser explicada por sua capacidade de precipitar as proteínas das células superficiais das mucosas e dos tecidos, formando uma camada protetora (complexo tanino-proteína e/ou polissacarídeo) sobre a pele ou mucosa danificada, impedindo, assim, o desenvolvimento de micro-organismos (HASLAM, 1996).

Carvalho et al (1996) realizaram um estudo preliminar com o extrato aquoso bruto dos frutos da planta *L. ferrea* para a avaliação de propriedades anti-inflamatórias e analgésicas. O edema induzido por carragenina na pata traseira de ratos foi significativamente inibido por administração oral de 300mg/kg deste extrato. Um efeito analgésico mediado centralmente não foi observado, no entanto, houve uma redução dependente da dose no número de contorções totais induzidas por ácido acético. Estas experiências demonstraram que o jucá possui propriedades analgésicas e anti-inflamatórias em comparação com as substâncias que são consideradas padrões para tais atividades, corroborando para o uso popular desta planta no tratamento de algumas doenças.

Conde (2006) avaliou a atividade antimicrobiana *in vitro* de plantas da Amazônia, entre elas a *L. ferrea*, sobre micro-organismos do biofilme dental. Os resultados demonstraram uma perspectiva positiva para a formulação de um enxaguatório a partir do extrato dessa planta, atrelado ao desenvolvimento tecnológico, seguindo as normatizações vigentes pela ANVISA (BRASIL, 2010), a qual, em RDC 014/10, prevê a necessidade da utilização de produtos que atendam aos itens de segurança, eficácia e qualidade do medicamento.

Marinho et al (2008) analisaram as propriedades físico-químicas da matéria-prima vegetal de *L. ferrea*, coletada em diferentes localidades na região de Manaus/AM. Os autores observaram haver diferenças significativas entre elas, principalmente, em relação ao teor extrativo que variou de 28,7 g% a 40,5 g%. O estudo comprovou haver influência de fatores tecnológicos no processo extrativo de substâncias químicas a partir da matéria-prima vegetal da planta, concluindo que a água parece ser o melhor líquido extrator, sendo a decocção o melhor método de extração.

Peters et al (2008) avaliaram a toxicidade do extrato aquoso do fruto da *L. ferrea*, administrado a ratas fêmeas *Wistar* durante o período de implantação do blastocisto (5° ao 7° dia de gestação). A toxicidade materna foi avaliada indiretamente por meio de fatores como peso corporal, consumo de alimentos, água, atividade locomotora, sangramento vaginal, fígado e mortes, dentre outros. Nenhuma das variáveis analisadas apresentou diferenças significativas, portanto, os autores concluíram que, nesse modelo, a *L. ferrea* não parece ser tóxica e nem interfere na implantação do blastocisto.

Com base nas propriedades terapêuticas e atividades já descritas para essa espécie, Cavalheiro et al (2009) estudaram as atividades biológicas no extrato de frutos de *L. ferrea* na busca por compostos de interesse industrial e farmacológico. Os resultados indicaram a presença das atividades celulásica, amilásica, anticoagulante e larvicida contra *Aedes aegypti* no extrato aquoso das sementes de *L. ferrea*, entretanto, não foram observadas as atividades tóxica aguda, hemolítica, heparinásica, antibacteriana e antifúngica.

Sampaio et al (2009) avaliaram a atividade antimicrobiana *in vitro* do extrato da fruta de *Libidibia ferrea* frente aos patógenos bucais (*C. albicans*,

*S.mutans*, *S.salivarius*, *S.oralis* e *L.casei*), através da técnica de microdiluição concluindo que o extrato foi efetivo contra os micro-organismos testados nas concentrações de 25, 40, 66, 100 e 66 µg/mL, respectivamente.

Barakat (2011) concluiu que os polifenóis são as prováveis substâncias responsáveis pela atividade terapêutica da *L. ferrea*, o que levou ao desenvolvimento de uma forma farmacêutica plástica contendo extrato dessa espécie vegetal. Foi realizada a validação de método analítico por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) e comprovada a presença de ácido gálico e ácido elágico, os quais foram selecionados como marcadores químicos obtendo boa reprodutibilidade para a análise da solução extrativa. A atividade antimicrobiana do extrato seco e de todas as formulações obtidas foi demonstrada frente às cepas de *E. coli*, *S. aureus*, *P. aeruginosa*, *S. epidermidis* e *C. albicans* empregando-se o método de difusão em Ágar e medição do halo de inibição. Os resultados obtidos demonstraram que tanto o extrato seco como todas as formulações do gel contendo o extrato apresentam atividade antimicrobiana e a melhor atividade foi frente à *C. albicans*. Entre as três formulações obtidas, a que apresentou melhor viabilidade foi o gel com 5% de extrato, pelo perfil reológico e antimicrobiano.

Pereira et al (2012) avaliaram frações polissacarídicas e os extratos das vagens de *L. ferrea* (*Caesalpinioideae*), quanto à atividade anti-inflamatória. As análises cromatográficas foram realizadas identificando-se os polissacarídeos totais. O método utilizado para avaliação do edema inflamatório em pata de ratos foi o da pletismografia. A toxicidade foi avaliada após o tratamento de sete dias com a fração de polissacarídeo mais ativo. Os resultados mostraram que os extratos e frações polissacarídicos de vagens de *L. ferrea* exibem

potente atividade anti-inflamatória através da modulação negativa de histamina, serotonina, bradicinina, prostaglandina E<sub>2</sub> e óxido nítrico libertado no edema induzido por carragenina, demonstrando o envolvimento na degranulação dos mastócitos. As frações polissacarídicas da planta apresentaram efeito anti-inflamatório, inibindo a migração celular, atuando diretamente ou indiretamente nos neutrófilos, havendo boa tolerância por parte dos animais nos testes de toxicidade em comparação ao controle de salina. Dessa forma, os polissacarídeos isolados de *L. ferrea* são candidatos ideais na construção de medicamentos anti-inflamatórios alternativos.

Costa (2012) desenvolveu e validou um método analítico de CLAE para a quantificação de polifenóis na matéria-prima vegetal de *L. ferrea*. O método desenvolvido e validado mostrou-se eficiente para a quantificação de ácido gálico, contemplando todos os critérios preconizados. O estudo demonstrou que os adjuvantes adicionados à solução extrativa não contribuíram para um rendimento superior quando comparado ao extrato seco sem adjuvante, por outro lado, o produto seco contendo apenas Aerosil<sup>®</sup> apresentou as melhores características reológicas e teve resultado satisfatório nas análises envolvendo rendimento, umidade residual e teor de taninos totais.

## **2.4 Enxaguatórios Bucais**

Bochecho é a agitação de infuso, decocto ou maceração na boca realizados com movimentos da bochecha, não devendo ser engolido o líquido ao final (BRASIL, 2011). A composição básica de um enxaguatório bucal compreende a harmonização do veículo (água, álcool, glicerina) com

flavorizante (mentol, eucaliptol, óleo de hortelã, etc.), além de um tensoativo e corante (ANDREOLLI e LARA, 2004).

As características ideais para um antisséptico são: ser um germicida potente e letal em baixas concentrações. Ter ação rápida ou lenta e possuir um espectro bacteriano amplo ou pequeno. Deve ser estável e não ser inativado pelas células do organismo, líquidos orgânicos ou exsudados das infecções. É desejável uma baixa tensão superficial para penetrar quando for aplicado topicamente, porém, não deve ser suficientemente absorvido pelos tecidos a ponto de causar toxicidade sistêmica. Deve possuir também um bom índice terapêutico e não deve induzir a hipersensibilidade quando for repetidamente aplicado (BURNET et al, 1978).

Agentes antimicrobianos são considerados meios de sucesso para a liberação de substâncias bactericidas ou bacteriostáticas, tais como compostos quaternários de amônio, bisbiguanidas, enzimas, sais metálicos, óleos essenciais e extratos de plantas (MARSH e MARTIN, 2005).

Existem duas razões que justificam a utilização deste método, a primeira diz respeito que tanto a cárie quanto a doença periodontal são de origem bacteriana, e deste modo substâncias antibacterianas poderiam ser utilizadas para combatê-las; e a segunda é pela existência de indivíduos que possuem dificuldades no controle mecânico do biofilme, e assim as substâncias antibacterianas poderiam tentar compensar a desmotivação para uma boa limpeza dos dentes (GEBRAN e GEBERT, 2002; GUNSOLLEY, 2010; MARSH, 2010).

Além da cárie e da doença periodontal, a candidíase é uma patologia importante, causada pela levedura do gênero *Candida*, pois aproximadamente

metade da população adulta saudável abriga essas espécies na cavidade bucal, sendo a *Candida albicans* o micro-organismo comensal evidenciado com maior frequência, atingindo até 70% do total de isolamentos, tendo um papel relevante no desencadeamento de infecções bucais. Essas leveduras são micro-organismos oportunistas que, na dependência de fatores predisponentes, que alteram a integridade orgânica, modificam a sua conformação leveduriforme para uma forma filamentosa, tornando-se patogênicas (JORGE et al, 1997; PEREIRA et al, 2009; RAMOS et al, 1999).

Ao selecionarmos e indicarmos substâncias antimicrobianas para os pacientes, devemos levar em conta fatores como: a) toxicidade – A maioria dos agentes antimicrobianos, por serem inespecíficos, podem provocar efeitos colaterais. Portanto, sua interação com os tecidos bucais deve ser bem conhecida, e sua segurança comprovada; b) permeabilidade aos tecidos – Deve ser baixa, considerando os efeitos sistêmicos das substâncias para a saúde; c) microbiota residente – Não deve provocar desequilíbrios, pois isto levaria a outras doenças decorrentes da proliferação de micro-organismos oportunistas; d) substantividade – Para que tenha o efeito desejado, a substância deve ser retida no local de ação (superfície dental, gengiva e mucosa bucal) e ser liberada lentamente, evitando que seu efeito seja rapidamente neutralizado pelo fluxo salivar. A substância selecionada deve reunir o maior número possível das características citadas, e sua efetividade ser comprovada por estudos tanto laboratoriais quanto clínicos (TORRES et al, 2000).

O desenvolvimento de um enxaguatório à base de plantas vem ao encontro dessas necessidades, uma vez que o uso de plantas já está difundido

entre a população, necessitando intensificar as pesquisas sobre as atividades antibacterianas, antifúngicas, antissépticas, cicatrizantes e imunodepressoras dessas plantas medicinais, visando facilitar o acesso da população a uma higiene bucal satisfatória e efetiva (BUSSADORI, 2013).

Vários são os produtos comercializados como antissépticos para higiene bucal, geralmente apresentando associações de substâncias ativas em sua formulação como cloreto de cetilperidínio e fluoreto de sódio; triclosan, copolímero PVM/MA e fluoreto de sódio; triclosan, copolímero PVM/MA, cloreto de cetilperidínio e fluoreto de sódio; digluconato de clorexidina e fluoreto de sódio (ZANIN et al, 2007).

A clorexidina está entre os antissépticos bucais mais utilizados, sendo uma bisguanidina catiônica que apresenta alta substantividade e amplo espectro de ação sobre bactérias Gram positivas, leveduras e dermatófitos (BUGNO et al, 2006; MARINHO e ARAÚJO, 2007).

Apesar da grande eficácia, a clorexidina pode trazer efeitos colaterais que limitam o uso prolongado desse antisséptico, como, por exemplo, manchamento de dentes, restaurações, próteses e língua, descamação da mucosa bucal, além de alteração do paladar (ALBANDAR et al, 1994; NOIRI et al, 2003).

Borghi, Moimaz e Saliba (2005) realizaram uma revisão de literatura sobre os métodos complementares para higienização bucal quanto à sua utilização na terapêutica medicamentosa odontológica (instrumentos mecânicos, cremes dentais e enxaguatórios associados a substâncias químicas naturais) concluindo que estes mostraram-se tão eficazes quanto os métodos convencionais, porém oferecem menor custo e maior facilidade de



aquisição, podendo ser recomendados em medidas de controle caseiro e programas coletivos de promoção de saúde.

Marinho e Araújo (2007) analisaram o uso dos enxaguatórios bucais sobre a gengivite e o biofilme dental através de uma revisão da literatura, onde foi possível observar que o controle químico do biofilme bacteriano constitui um método eficaz no auxílio do controle mecânico, no entanto sem substituí-lo. Os resultados dos estudos com enxaguatórios bucais fitoterápicos mostram a importância e a necessidade de se avaliar meios alternativos e economicamente viáveis para o controle do biofilme bacteriano, facilitando o acesso das populações mais carentes aos enxaguatórios bucais.

Um levantamento de quatorze enxaguatórios de venda livre ao consumidor, realizado por Zanin et al (2007) e desenvolveu um enxaguatório bucal com os ativos triclosan, fluoreto de sódio e extrato hidroalcoólico de sálvia, conforme características desejadas para esses produtos, como ausência de turbidez e palatabilidade agradável. A sálvia possui atividade antimicrobiana e por sua ação antisséptica, foi utilizada como ativo adjuvante ao triclosan.

Santos et al (2010) avaliaram *in vitro* o efeito do óleo essencial de *Thymus vulgaris* (tomilho) puro ou incorporado em enxaguatório bucal, frente ao *Streptococcus mutans* (ATCC 25175), determinando-se sua CIM e o efeito na formação do biofilme dental. A CIM obtida para o óleo essencial de tomilho foi de 100 µg/mL (1%). As análises da formação do biofilme (ensaios microbiológicos), análise macroscópica de aderência e análises por microscopia eletrônica de varredura confirmaram a eficácia destas novas formulações de enxaguatórios, sem álcool, contendo óleo essencial de *T.*

*vulgaris* como agentes antibiofilme, com possível emprego na Odontologia preventiva. A caracterização química do óleo essencial bioativo foi realizada por cromatografia gasosa com detecção por espectrometria de massas (CG-MS), verificando-se a presença de carvacrol, p-cimeno e  $\alpha$ -pineno como constituintes majoritários. Verificou-se também que o conservante utilizado nas formulações pode agir como um coadjuvante, visto que a formulação controle (branco, sem o óleo essencial de tomilho) e com conservante inibiu macroscopicamente a aderência de bactérias à superfície sólida e apresentou efeito bacteriostático.

Simões et al (2011), analisaram o potencial antimicrobiano *in vitro* dos enxaguatórios bucais: Periogard<sup>®</sup>, Plax<sup>®</sup>, Oral-B<sup>®</sup>, Flogoral<sup>®</sup> e Listerine<sup>®</sup>, frente às cepas: *P. aeruginosa*, *E. coli*, *C. albicans*, *S. aureus*, *S. epidermidis* e *E. faecalis*, por meio do método de difusão em Ágar. Cinco discos de papel filtro foram colocados em pontos equidistantes e foram embebidos com 20  $\mu$ L dos enxaguatórios testados. As leituras dos halos foram realizadas após 48 horas. O Periogard<sup>®</sup>, cujo principal componente é o digluconato de clorexidina a 0,12%, e o Plax<sup>®</sup>, cujo triclosan-gantrez é o principal componente, apresentaram atividade antimicrobiana sobre todas as cepas testadas. O enxaguatório da Oral-B<sup>®</sup> apresentou atividade antibacteriana intermediária e o Listerine<sup>®</sup> e Flogoral<sup>®</sup> não apresentaram nenhuma inibição nos microorganismos testados.

Vinagre et al (2011) avaliaram clinicamente o desempenho de um enxaguatório bucal fitoterápico contendo tintura padronizada de *Calendula officinalis*, na melhora da saúde periodontal de 40 indivíduos, comparando ao desempenho de um colutório de clorexidina a 0,12%. Os parâmetros clínicos

utilizados foram nível clínico de inserção, sangramento marginal, Índice de Placa de O'Leary e Índice Gengival. Os resultados mostraram similaridade no desempenho de ambos os enxaguatórios na maioria dos parâmetros analisados, sendo a diferença significativa apenas quanto ao Índice Gengival, no qual a clorexidina superou o fitoterápico. Portanto, o enxaguatório contendo *C. officinalis* pode ser sugerido como uma solução inovadora que atua promovendo benefícios adicionais à melhoria da saúde periodontal.

Borges et al (2010) realizaram um estudo *in vitro* para avaliar a ação antimicrobiana de enxaguatórios bucais com e sem álcool (Periogard<sup>®</sup>, o CEPACOL<sup>®</sup>, Plax Classic<sup>®</sup> e o ORAL-B<sup>®</sup>, antisséptico sem álcool) para os seguintes micro-organismos: *S. aureus*, *C. albicans*, *E. faecalis*, *P. aeruginosa*. Os resultados do estudo mostraram que o Periogard<sup>®</sup> com álcool e o sem álcool apresentaram os melhores resultados. O Plax<sup>®</sup> sem álcool obteve os piores resultados. O Plax<sup>®</sup> com álcool foi melhor substância em relação ao *S. aureus*, concluindo que os enxaguatórios sem álcool não têm a mesma eficácia antimicrobiana comparada aos enxaguatórios com álcool em relação aos micro-organismos testados.

Pithon et al (2011) estudaram a atividade *in vitro* da citotoxicidade de enxaguatórios bucais com e sem álcool, com o objetivo de verificar a hipótese de que os sem álcool apresentam menor citotoxicidade quando comparado aos com álcool. Foram avaliados os enxaguatórios Plax: Convencional (com e sem álcool) em diferentes tempos: 1, 15, 30, 45, 60 e 120 segundos. O ensaio de citotoxicidade foi realizado utilizando cultura celular de fibroblasto de camundongo (L929). Após contato do enxaguatório com as células, as mesmas foram colocadas em contato com o corante vital vermelho neutro utilizando-se

a técnica ("dye uptake"). Após análise estatística, os resultados demonstraram que a hipótese foi confirmada em parte, haja vista que os enxaguatórios sem álcool apresentaram menor citotoxicidade que os com álcool, mas ainda apresentaram citotoxicidade quando comparados aos grupos controle de célula e negativo.

Moreira, Ferreira e Hashizumi (2012) analisaram a atividade antimicrobiana *in vitro* dos componentes (tirotricina, quinosol e tintura de malva) de um enxaguatório bucal contendo malva (Malvatricin<sup>®</sup>) sobre *S. mutans*, *Lactobacillus* spp. e um *pool* de micro-organismos da cavidade bucal através do método da difusão em ágar-cilindro em placas. Foram utilizadas dez placas com ágar *Brain Heart Infusion* (Infusão cérebro e coração) para cada micro-organismo e foram testadas as seguintes soluções: Malvatricin<sup>®</sup>, tirotricina, quinosol e tintura de malva, tendo como controle positivo a clorexidina a 0,12%. As placas foram incubadas (24 h/ 37°C) em anaerobiose. Após 24 horas, mensuraram-se os diâmetros das zonas de inibição. Os resultados sugerem que, dentre os componentes presentes na composição do produto comercial Malvatricin<sup>®</sup>, a substância quinosol, apresenta a maior atividade antimicrobiana frente aos micro-organismos testados e que a atividade antimicrobiana verificada para o produto comercial provavelmente deva-se à ação desta substância presente na sua composição.

Bussadori (2013) avaliou comparativamente dois enxaguatórios bucais, um de natureza comercial (Cepacol<sup>®</sup>) e outro não comercial, elaborado com extratos hidroalcoólicos das plantas *Nasturtium officinale* (agrião), *Rosmarinus officinalis* (alecrim), *Tabebuia impetiginosa* (ipê-roxo), *Achillea millefolium* (mil folhas) e *Plantago major* (tanchagem), desenvolvidos na Faculdade de

Ciências Farmacêuticas/UNESP Araraquara. Foram selecionados 40 pacientes entre 18 e 45 anos, usuários de aparelho ortodôntico fixo, divididos em dois grupos, o grupo do Cepacol® e o grupo do enxaguatório à base de plantas. Foram coletadas amostras nos períodos de 0, 7, 15 e 21 dias e analisadas observando-se as UFC de cada amostra. Houve uma queda significativa da quantidade de bactérias após o uso do enxaguatório à base de plantas, concluindo-se que este pode ser um produto de extrema utilidade no auxílio do controle do acúmulo de biofilme bacteriano sobre as superfícies dentais.

## **2.5 Erosão dentária e Alteração de cor**

O esmalte dental pode sofrer perda mineral sem que para isso seja necessária a presença de bactérias que compõe o biofilme dental. A ação de ácidos provenientes de fontes extrínsecas (dieta), de fontes intrínsecas (refluxo gástrico, anorexia nervosa, dentre outros) ou de fontes desconhecidas (idiopáticas), também é capaz de causar este processo, denominado erosão (AMAECCHI et al, 2005; BURRATO et al, 2002; THYSTRUP e FEJERSKOV, 1998).

Segundo Barbour e Rees (2004), a erosão dental é a perda de tecido duro, ácido induzida, que não envolve bactérias e, é, portanto, não associada ao biofilme dental. Os fatores etiológicos da erosão dental são frequentemente classificados em dois grupos: fatores intrínsecos e extrínsecos. Agentes extrínsecos incluem: substâncias ácidas, bebidas, alimentos, medicação e exposição a ambientes com agentes ácidos. Causas intrínsecas incluem

vômitos recorrentes como parte de distúrbios alimentares (anorexia ou bulimia nervosa) ou à regurgitação do conteúdo gástrico (refluxo gastro-esofágico).

A erosão dental tem início com a desmineralização das camadas superficiais do esmalte, podendo evoluir para perda importante de estrutura. Qualquer substância ácida com pH inferior ao crítico para o esmalte (5,5) e dentina (4,5) pode dissolver os cristais de hidroxiapatita (GRIPPO, SIMRING e SCHREINER, 2004), inclusive enxaguatórios bucais que são vendidos livremente e têm potencial erosivo (ZERO, 1996).

Fatores biológicos estão relacionados com a erosão dentária, onde as suas propriedades e características influenciam este processo, como: a saliva, película adquirida, tipo de estrutura dentária, anatomia dentária e oclusão, anatomia dos tecidos moles em relação aos dentes e movimentos fisiológicos dos tecidos (ALVES et al, 2012; HARA et al, 2006; KELLEHER et al, 2012).

Diversas técnicas para determinar a perda mineral dos tecidos duros podem ser realizadas através da perfilometria (SCHLUETER, KLIMEK e GANSS, 2011), microscopia eletrônica de varredura (KATO et al, 2010) e testes de nano ou microdureza (MAGALHÃES et al, 2008), entre outras.

A durometria é um ensaio laboratorial amplamente utilizado. Essa técnica analisa a dureza do espécime, com pontas Knoop ou Vickers, antes e após a exposição à substância que se está testando (XAVIER et al, 2010).

Santos, Aguiar e Cavalcanti (2013) afirmaram que o estudo da erosão dentária, principalmente em pesquisas *in situ*, devido às diversas variáveis que interferem no desenvolvimento da lesão, pode ter seus resultados afetados direta ou indiretamente. A falta de padronização das metodologias adotadas leva à produção de um conhecimento científico que dificulta comparações entre

os diferentes estudos. De acordo com Shellis et al (2011) o teste da microdureza é o mais eficiente, sendo o penetrador Knoop um método mais indicado.

Miranda et al (2011) realizaram um estudo *in vitro* para avaliar o efeito de diferentes enxaguatórios bucais na rugosidade superficial e dureza Knoop de duas resinas compostas. Oitenta espécimes (6 mm  $\varnothing$  e 2 mm de altura) foram preparados e divididos em oito grupos experimentais (n = 10) de acordo com as resinas compostas (4 Seasons e Esthet X) e soluções de armazenamento (G1 - água destilada; G2 - Colgate Plax Overnight; G3 - Colgate Plax Sem Álcool e G4 - Colgate Plax Whitening). A dureza inicial e leituras de rugosidade (T1) foram medidos e, em seguida, as amostras foram armazenadas em 2 mL de bochechos durante 12 h (T2) e 24 h (T3), os resultados mostraram que os enxaguatórios bucais que continham peróxido de hidrogênio e/ou álcool diminuíram a dureza das resinas testadas, contudo o enxaguatório bucal contendo peróxido de hidrogênio apresentou maior efeito deletério sobre a rugosidade.

O aumento das exigências estéticas dos pacientes levanta questões sobre as alterações de cor dos dentes. Fatores como dieta e produtos químicos podem causar alterações na cor do dente de acordo com a frequência e período de exposição (MOREIRA et al, 2013).

As alterações de cor dos dentes podem ocorrer no íntimo da estrutura dental (mancha intrínseca) ou sobre o dente, na superfície do esmalte (mancha extrínseca) (GUEDES et al, 2009; LAGO, 2009).

A relativa permeabilidade do esmalte, agravada pela ocorrência de poros, se configura como elemento facilitador do surgimento das manchas

externas, favorecendo a agregação e deposição das mais diversas substâncias de baixo peso molecular, como as presentes no café, chá preto, tabaco e vinho tinto, dentre outras. Essa condição acelera o processo de impregnação de pigmentos e corantes no dente (ARAÚJO et al, 2007).

As manchas extrínsecas originadas por pigmentação direta são aquelas causadas pelo chá, café e outros alimentos, cigarro e higiene oral insatisfatória (acúmulo de biofilme); e as manchas extrínsecas indiretas são aquelas causadas por sais metálicos polivalentes e antissépticos catiônicos, por exemplo, a clorexidina (SULIEMAN, 2008).

O manchamento dental acomete entre 30-50% dos usuários de clorexidina sendo que sua maior ocorrência se dá no terço cervical da coroa dentária e nas áreas proximais, sendo o principal fator limitante da sua utilização por longos períodos (ALBANDAR et al, 1994; AL-TANNIR e GOODMAN, 1994; FLÖTRA, 1971; ZANATTA e RÖSING, 2007).

Dentre os fatores que interferem na prevalência e severidade do manchamento, estão a concentração e o volume utilizados da clorexidina. Assim, concentrações menores, em volumes maiores, a despeito de apresentarem eficácia e efetividade semelhantes, mostraram causar menor manchamento dentário (CUMMING e LÖE, 1973; ZANATTA e RÖSING, 2007).

Moreira et al (2013) estudaram a alteração de cor de dentes expostos a diferentes enxaguatórios bucais, utilizando dentes bovinos que foram distribuídos em quatro grupos: controle (saliva artificial), enxaguatório bucal contendo álcool (Listerine<sup>®</sup>), enxaguatório bucal sem álcool (Oral-B<sup>®</sup>) e clorexidina (Periogard<sup>®</sup>). Os dentes foram submetidos a dois ciclos de coloração e envelhecimento artificial. A avaliação da cor foi realizada com um



espectrofotômetro digital no início da experiência e depois de cada ciclo. As mudanças de cor foram caracterizadas utilizando o sistema definido pela Comissão Internationale de L'Eclairage (CIE  $L^*$ ,  $a^*$ ,  $b^*$ ). Os resultados mostraram que o Listerine<sup>®</sup> apresentou mudança de cor visualmente perceptível, enquanto que não houve alteração de cor clinicamente perceptível nos demais grupos.

### 3. OBJETIVOS

#### Objetivo Geral

Avaliar *in vitro* a estabilidade farmacológica de um enxaguatório bucal fitoterápico à base do extrato de *Libidibia ferrea*.

#### Objetivos Específicos

- Realizar a caracterização físico-química, organoléptica e microbiológica do enxaguatório de *L. ferrea*;
- Determinar a atividade antimicrobiana do enxaguatório de *L. ferrea* frente a micro-organismos presentes no biofilme bucal;
- Avaliar a citotoxicidade do enxaguatório de *L. ferrea*;
- Mensurar o potencial erosivo do enxaguatório de *L. ferrea* sobre o esmalte de dentes bovinos;
- Avaliar o efeito do enxaguatório bucal à base do extrato de *L. ferrea* sobre a alteração de cor em dentes bovinos.

## 4. MATERIAIS E MÉTODOS

### 4.1 Obtenção da matéria-prima vegetal

A espécie botânica *Libidibia ferrea* (228.022 - INPA) (Figura 1) foi coletada no Instituto Nacional de Pesquisa da Amazônia (INPA) e processada na Faculdade de Ciências Farmacêuticas (FCF/UFAM).

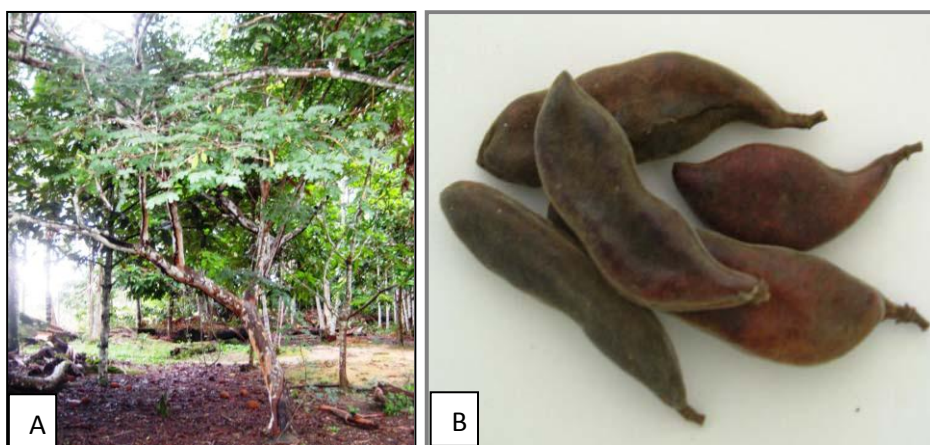


Figura 1: A – Árvore de *L. ferrea*; B – Frutos (vagens) de *L. ferrea*.  
Fonte: INPA/MARREIRO (2011)

### 4.2 Preparação do extrato

O fruto da espécie *L. ferrea* foi colocado para secar em estufa (Solab, SL 102/210, Piracicaba, São Paulo), seguindo-se a preparação do extrato de acordo com os princípios de assepsia para preservar a qualidade do material.

A solução extrativa do jucá foi preparada da seguinte forma: foram pesadas 75 g da vagem de jucá com balança analítica (Shimadzu, AY 220, precisão de 0,01 mg), acrescentado em 500 mL de água destilada e 500 mL de

álcool a 96%. Em seguida, colocou-se todo o conjunto para decocção por um período de 15 min em manta térmica e sob refluxo.

Após esse período, o material foi retirado, esfriado e filtrado. O mesmo foi colocado em um balão volumétrico de 1000 mL, completando o volume com água destilada. A solução extrativa de jucá foi levada para o aparelho *Spray Dryer* (MSD 1.0, Labmaq, Ribeirão Preto, São Paulo, Brasil) para que fosse obtido o extrato seco por aspersão visando reduzir a pó e para manter a estabilidade (Figura 2).

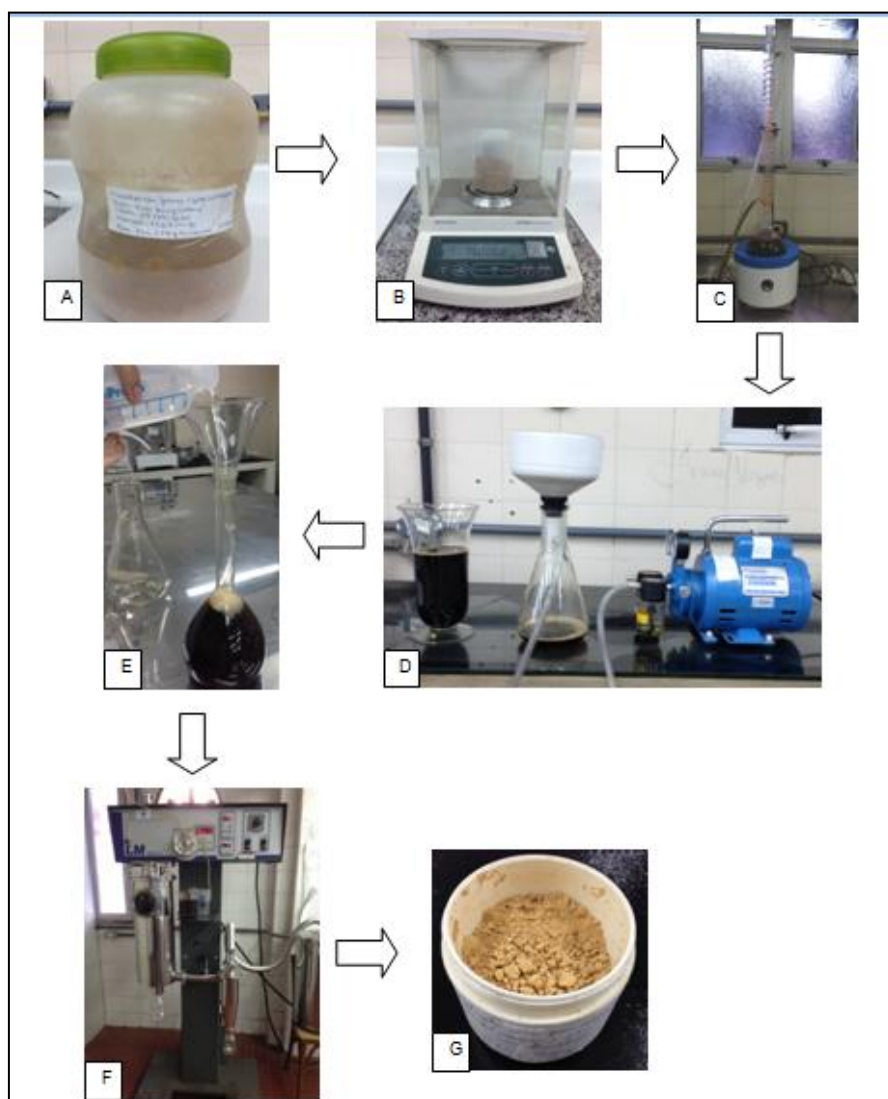


Figura 2: A – Vagem seca de *L. ferrea*; B – Pesagem; C – Decocção; D – Filtragem; E – Balão volumétrico de 1000 mL; F – Aparelho *Spray Dryer*; G – Extrato da vagem de *L. ferrea*

### 4.3 Formulação do enxaguatório bucal

A solução do extrato seco da planta foi preparada baseada na concentração inibitória mínima determinada na pesquisa de Marreiro (2011). A composição da formulação seguiu aos mesmos padrões das formulações atualmente utilizadas no mercado, porém com o princípio ativo da *L. ferrea*.

A formulação do enxaguatório de *L. ferrea* seguiu a metodologia adaptada de Zanin et al (2007). Os componentes foram: benzoato de sódio, sacarina, glicerina, extrato de *L.ferrea*, Tween 80%, Tween 20%, água destilada, essência da menta e hidróxido de sódio 10% (Tabela 1) (Figura 3).

Extrato	0,2 g
Sacarina	0,03 g
Benzoato de sódio	0,06 g
Glicerina	0,8mL
Tween 80%	0,8 mL
Tween 20%	0,8 mL
Água destilada	20 mL
Essência de menta	0,08 mL
Hidróxido de Sódio 10%	q.s.p. pH $\cong$ 6,3 (1 gota/ mL)

Tabela 1 – Componentes utilizados para a formulação de 20 mL do enxaguatório de *L. ferrea*



Figura 3 – Enxaguatório de *L. ferrea*

#### **4.4 Avaliação da concentração inibitória mínima (CIM) do enxaguatório de *Libidibia ferrea***

##### 4.4.1. Micro-organismos testes e preparação dos inóculos

Os micro-organismos utilizados: *Streptococcus mutans* (ATCC 25175), *Streptococcus oralis* (ATCC 10557), *Streptococcus salivarius* (ATCC 7073), *Lactobacillus casei* (ATCC 7469) e *Candida albicans* (DPUA 1706).

As cepas bacterianas foram fornecidas pelo laboratório de Biologia Bucal da Universidade Federal da Paraíba e Instituto Nacional de Controle de Qualidade de Saúde da Fundação Oswaldo Cruz (Rio de Janeiro). A levedura foi fornecida pelo Departamento de Parasitologia da UFAM (DPUA). Para o desenvolvimento da pesquisa foram utilizados os equipamentos do laboratório de Microbiologia da Faculdade de Odontologia, do laboratório de Tecnologia Farmacêutica da Faculdade de Ciências Farmacêuticas e do Laboratório de Micologia da UFAM.

Para a obtenção do inóculo os micro-organismos foram reativados em caldo nutritivo BHI (*Brain Heart Infusion* – DIFCO™), em tubos de ensaio 10x150 mm, incubados (37 °C/ 24 h) em aerofilia, para *S. oralis*, *S. salivarius*, *L. casei*, e em microaerofilia para *S. mutans*. Para a *C. albicans*, a reativação foi feita em caldo nutritivo Sabouraud em tubos de ensaio 10x150 mm, incubados (37 °C/ 48 h) em aerofilia e posteriormente realizou-se o subcultivo da levedura em ágar Sabouraud nas mesmas condições de incubação.

O inóculo dos micro-organismos foi preparado em condições assépticas: para as bactérias foram retiradas alíquotas do cultivo em caldo BHI que em seguida foram inoculadas em 5 mL de solução salina estéril. Para a *C. albicans*, o inóculo foi preparado a partir de colônias jovens com o auxílio de

uma alça de platina esterilizada (5 mm de diâmetro) em tubos de ensaio contendo solução salina estéril. As suspensões foram vigorosamente agitadas em Vortex até se tornarem homogêneas. A padronização do inóculo foi feita pela escala 0.5 de McFarland de modo a fornecer um padrão de  $10^8$  UFC/mL para bactérias e  $10^6$  células / mL para a levedura.

#### 4.4.2. Determinação da atividade antimicrobiana do enxaguatório de *Libidibia ferrea*.

A atividade antimicrobiana do enxaguatório de *L. ferrea* foi determinada segundo metodologia da Concentração Inibitória Mínima (CIM) em microdiluição em caldo proposta por NCCLS (2003), Andrews et al (2001), adaptado de Sampaio (2009). O digluconato de clorexidina a 0,12% foi utilizado como controle.

Todo o procedimento foi realizado em capela de fluxo laminar e com vidrarias, ponteiras e meios de cultura previamente esterilizados. Foram utilizadas microplacas de 96 orifícios (em formato de “U”), de forma que em cada poço houvesse um volume final de 100  $\mu$ L. Na placa, as colunas foram distribuídas nos números de 1 a 12 e as linhas nas letras “A” até “F”. Nos poços foram distribuídos os produtos testes de forma a conter diferentes concentrações. O sistema de diluição foi controlado pelo volume dos produtos testes, ocupando os poços 2 a 11. Nos mesmos poços, foi acrescentado um volume padrão de inóculo (20  $\mu$ L) e completado o volume final com meio (Tabelas 2 e 3).

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A				Enxaguatório de <i>L. ferrea</i>								
B				Enxaguatório de <i>L. ferrea</i>								
C				Enxaguatório de <i>L. ferrea</i>								
D				Clorexidina a 0,12%								
E				Veículo								
F				NaOH a 10%								
G												
H												
MEIO (µL)	20	10	15	20	25	30	35	40	45	50	55	80
SOLUÇÃO (µL)	80	70	65	60	55	50	45	40	35	30	25	0
INÓCULO (µL)	0	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20

Tabela 2: Valores referentes ao volume em µL da placa de microdiluição.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
A	0,8	0,7	0,65	0,6	0,55	0,5	0,45	0,4	0,35	0,3	0,25
B	0,8	0,7	0,65	0,6	0,55	0,5	0,45	0,4	0,35	0,3	0,25
C	0,8	0,7	0,65	0,6	0,55	0,5	0,45	0,4	0,35	0,3	0,25
D	0,096	0,084	0,078	0,072	0,066	0,06	0,054	0,048	0,042	0,036	0,03
E	79,2	69,3	64,35	59,4	54,45	49,5	44,55	39,6	34,65	29,7	24,75
F	8	7	6,5	6	5,5	5	4,5	4	3,5	3	2,5
G											
H											
EXTRATO	0,06	0,052	0,048	0,045	0,041	0,037	0,033	0,003	0,026	0,022	0,018

Tabela 3: Valores referentes à Concentração Final em mg/mL em cada poço da placa de microdiluição, onde: A, B e C – Enxaguatório de *L. ferrea*, D – Clorexidina a 0,12%, E – Veículo; F – NaOH a 10% e do Extrato.

A coluna 01 representou a esterilidade da substância teste (enxaguatório + meio sem inóculo). A coluna 12 representou a viabilidade dos micro-organismos (meio + inóculo sem produto teste). As linhas A, B e C representaram o enxaguatório de *L. ferrea* em triplicata. A linha D o digluconato de clorexidina a 0,12% (controle positivo), a linha E representou o veículo (controle negativo) e a linha F o componente Hidróxido de sódio (NaOH) a 10% (Figura 4).



Após o preenchimento de todos os poços, as microplacas foram seladas com parafilme e incubadas (37 °C/ 24 h), em aerofilia para o *S. oralis*, *S. salivarius*, *L. casei* e *C. albicans* e, em microaerofilia para o *S. mutans*.

Terminado o período de incubação, foram adicionados em cada orifício das placas 30 µL de resazurina a 0,01% em solução aquosa esterilizada onde, após 1 h de reincubação, a leitura foi realizada.

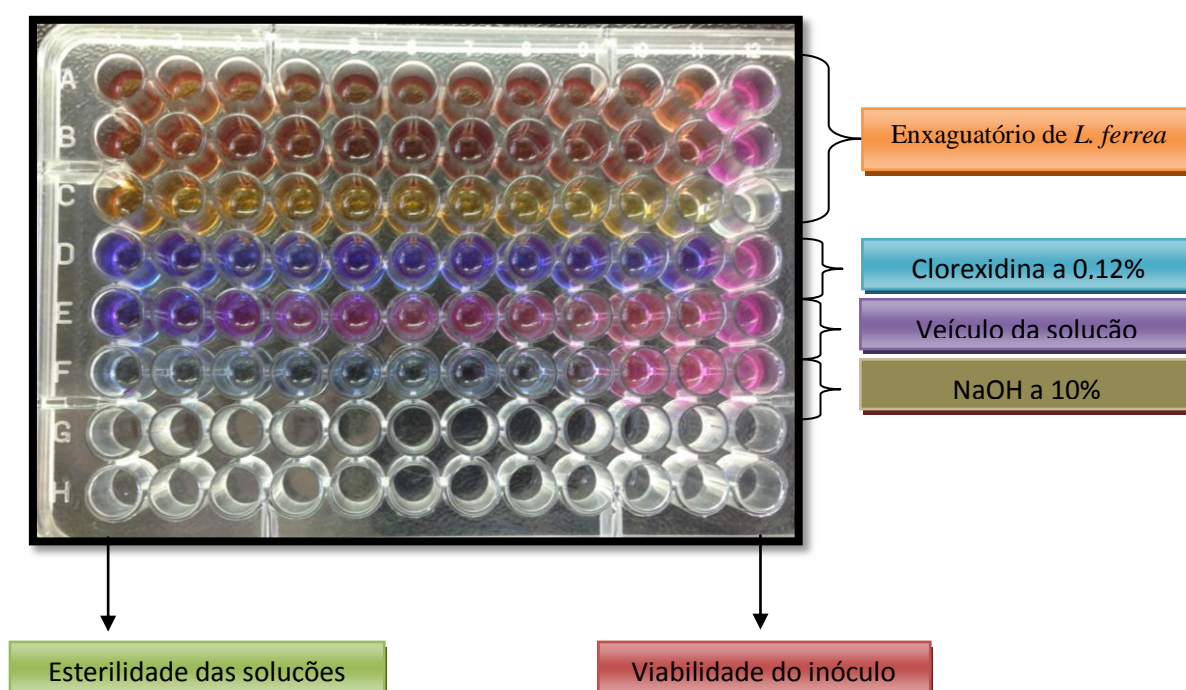


Figura 4: Distribuição das substâncias testes na placa

A ausência da mudança de cor nos orifícios foi interpretada como micro-organismo sensível à solução testada. Para a confirmação da CIM foram retiradas alíquotas de todos os poços para inóculo em meio Ágar BHI (*S. mutans*, *S. oralis*, *S. salivarius* e *L. casei*) e, em meio Ágar Sabouraud (*C. albicans*). Os cultivos das bactérias foram incubados a 37 °C por 24 h e da levedura a 37 °C por 48 h, determinando assim a menor concentração capaz de inibir o crescimento dos micro-organismos.

## 4.5 Caracterização da formulação

### 4.5.1 Aferição do pH

O pH do enxaguatório de *L. ferrea* foi aferido através do uso do peagâmetro (pHmeter TEC-2/ Tecnal/Piracicaba/São Paulo), previamente calibrado (Figura 5). A determinação do pH foi realizada em triplicata, nos tempos 0, 30 e 60 dias, pela média de potencial entres as aferições de aproximadamente 10 mL da solução (FARMACOPÉIA BRASILEIRA, 2010).



Figura 5: Peagâmetro

### 4.5.2 Teste de sedimentação

Foi baseado na velocidade rotativa de tubos falcon (Kasvi, K19-0050, Curitiba, Paraná, Brasil) contendo 35 mL do enxaguatório, em triplicata, nos tempos de 0, 30 e 60 dias, utilizando-se uma centrífuga (Centrifuge 5804R, Eppendorf, AG, Alemanha) em 900 g durante 5 minutos, para a verificação de uma possível separação das fases da solução (Figura 6).



Figura 6: Centrífuga (Centrifuge 5804R/Eppendorf/AG/Alemanha)

#### 4.5.3 Determinação da densidade do enxaguatório de *Libidibia ferrea*

A densidade do enxaguatório foi determinada seguindo a Farmacopéia Brasileira (2010). Foram definidas as densidades no picnômetro de 25 mL (vazio, com água destilada e com o enxaguatório), em triplicata, nos tempos de 0, 30 e 60 dias, utilizando-se uma balança analítica (Shimadzu AY220/China) (Figuras 7 e 8).

A densidade foi calculada segundo a equação:

$$\text{Densidade} = \frac{m(\text{Solução})}{m(\text{água})}$$

Onde:  $m(\text{Solução}) = \text{Picnômetro com solução} - \text{Picnômetro vazio}$ ;  
 $m(\text{água}) = \text{Picnômetro com água} - \text{Picnômetro vazio}$ .



Figura 7: Pícnômetro vazio



Figura 8: Pícnômetro com enxaguatório de *L. ferrea*

#### 4.5.4 Estudo da estabilidade do enxaguatório

Foram avaliadas as características organolépticas (cor, odor, brilho e consistência) para cada período experimental (0, 30 e 60 dias), segundo RDC 211/05 (BRASIL, 2005).

#### 4.5.5. Avaliação microbiológica para a pesquisa de contaminantes - Controle microbiológico do enxaguatório de *Libidibia ferrea*

O controle microbiológico do enxaguatório de *L. ferrea* consistiu na determinação do número total de micro-organismos e pesquisa de *Salmonella* sp., *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Staphylococcus aureus*, conforme preconizados na Farmacopéia Brasileira (2010), *British Pharmacopeia* (2001) e USP (UNITED, 2003), para análise microbiológica de produtos não-estéreis, como se segue:

##### - Contagem total de micro-organismos

Foram transferidos, assepticamente, 1 mL do enxaguatório de *L. ferrea* para 9 mL de solução tampão fosfato pH 7,2, para a contagem dos micro-organismos totais.

Amostras nas proporções (1:10; 1:100; 1:1000 e 1:10.000) foram submetidas à agitação durante 10 min. Após a homogeneização, foi pipetado 1,0 mL de cada amostra e adicionados 20,0 mL de ágar tioglicolato (DIFCO™) para bactérias e ágar Sabouraud (DIFCO™) para leveduras, em placas de Petri, que foram colocadas em estufa a 35 °C por 24 h e 25 °C por 7 dias para a pesquisa de bactérias e fungos, respectivamente (Figura 9). Após este período, caso houvesse colônias suspeitas, seria realizada a contagem do número de colônias com o auxílio de contador de colônias, calculando o número de unidades formadoras de colônia (UFC/mL).

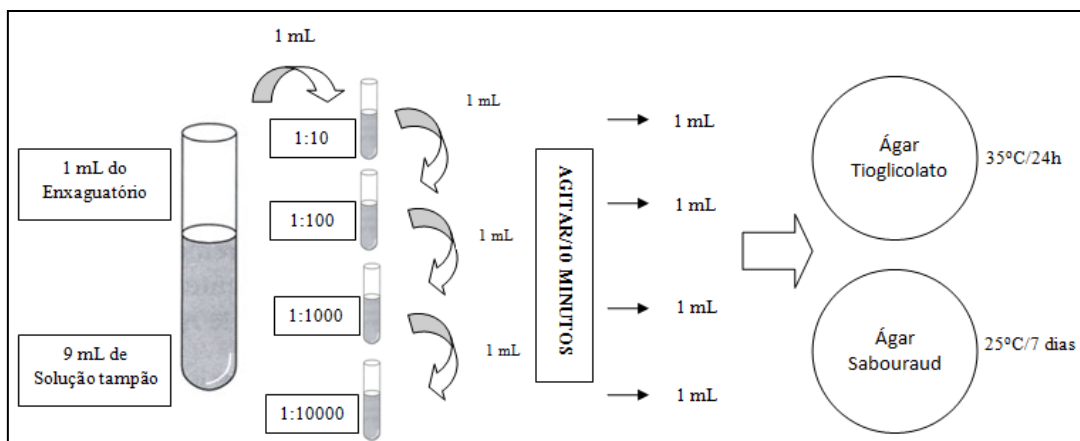


Figura 9: Esquema para a contagem total de micro-organismos

#### - Pesquisa de *Salmonella sp* e *Escherichia coli*

Foram transferidos 1 mL do enxaguatório de *L. ferrea* para 9 mL de caldo lactosado, para pesquisa de *Salmonella sp* e *E. coli*, incubados a 35°C durante 24 a 48h. Após este período, 1 mL do caldo lactosado (DIFCO™) foi transferido para dois tubos contendo caldo tetrionato (DIFCO™) e caldo selenito cistina (DIFCO™), que foram incubados a 35°C por 24h. Após este período, a amostra foi semeada do caldo tetrionato para um tubo contendo ágar verde brilhante (DIFCO™) e duas placas de Petri contendo ágar xilose-lisina-desoxicolato (XLD) (DIFCO™) e ágar bismuto sulfito (DIFCO™). Foi realizado da mesma forma com a amostra inoculada no caldo selenito cistina, transferindo para os três meios já citados, os quais foram incubados a 35°C por 24h (Figura 10). As características e o crescimento das colônias foram observados. Caso houvesse colônias suspeitas, as mesmas seriam semeadas com agulha bacteriológica em tubo contendo ágar tríplice açúcar-ferro (TSI) (DIFCO™) e incubadas a 35°C por 24h.

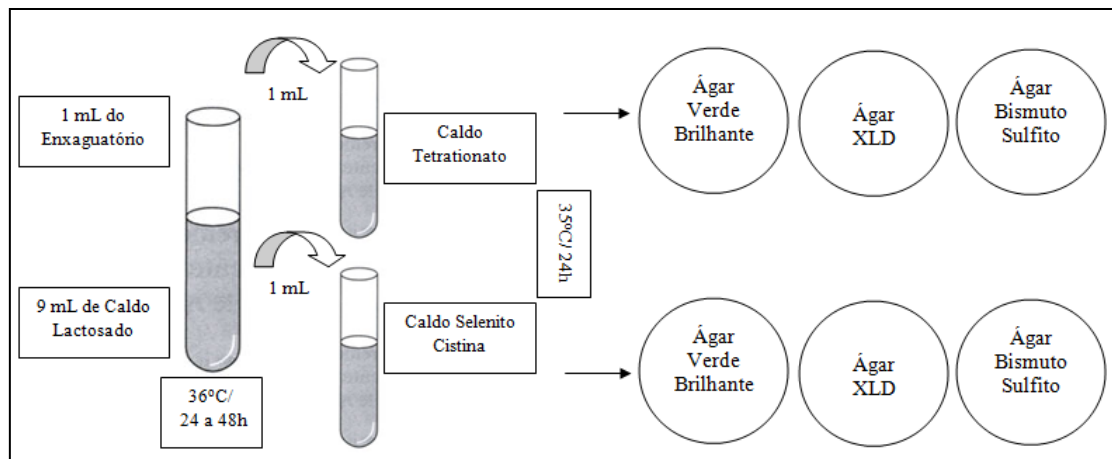


Figura 10: Esquema para a pesquisa de *Salmonella* sp

Na pesquisa de *E. coli*, 1 mL do caldo lactosado foi transferido para placa contendo ágar Mac Conkey (DIFCO™) e incubado a 35°C por 24h. Caso houvesse colônias suspeitas, estas seriam semeadas em ágar eosina azul de metileno (DIFCO™) e incubadas a 35°C por 24h (Figura 11).

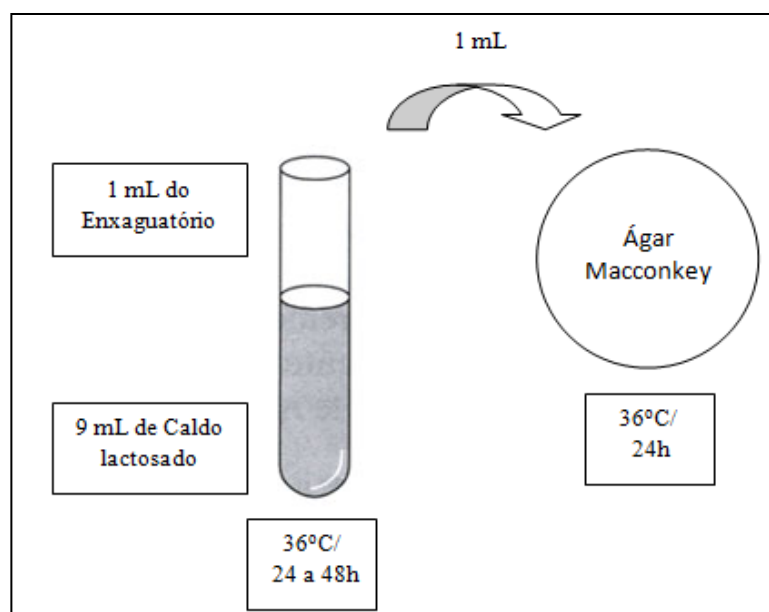


Figura 11: Esquema para a pesquisa de *E. coli*

- Pesquisa de *Staphylococcus aureus* e *Pseudomonas aeruginosa*

Foram transferidos, assepticamente, 1 mL do enxaguatório de *L. ferrea* para 9 mL de caldo soja caseína, para a pesquisa de *S. aureus* e *P. aeruginosa* e incubados a 35 °C por 24 a 48h. Após este período, foi semeado em ágar Vogel Johnson (DIFCO™), para a pesquisa de *S. aureus* (Figura 12) e ágar Cetrimida (DIFCO™), para a pesquisa de *P. aeruginosa* (Figura 13) a 35°C por 24 h.

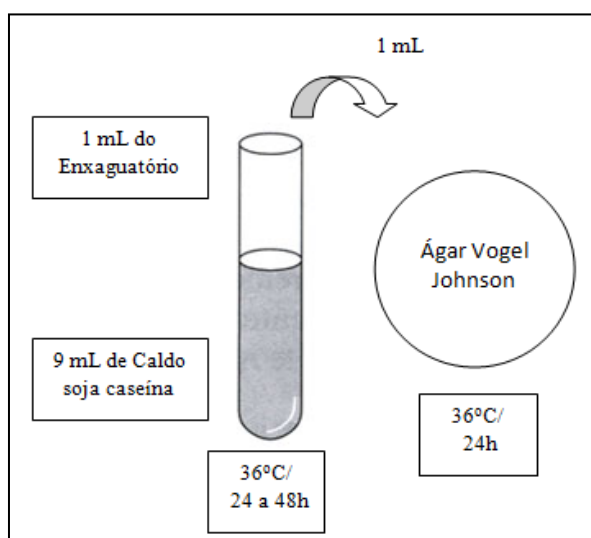


Figura 12: Esquema para a pesquisa de *S. aureus*

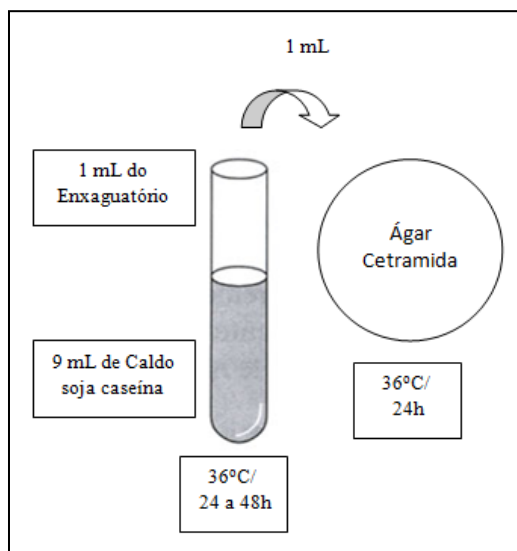


Figura 13: Esquema para a pesquisa de *P. aeruginosa*



#### 4.6. Teste de hemólise

A metodologia foi realizada de acordo com o descrito por Parnham e Wetzig (1993), com adaptações de Fisher et al (2002), permitindo avaliar o potencial das substâncias (extrato da vagem de jucá, enxaguatório de jucá nos tempos 0, 30 e 60 dias, veículo do enxaguatório e clorexidina a 0,12%) em causar lesões na membrana plasmática da célula, seja pela formação de poros ou pela ruptura total.

##### - Preparo da Solução Eritrocitária a 2%

Após a coleta de sangue de camundongos *Mus musculus* (CEEA-UFAM 116/2012) em tubo heparinizado, 1 mL deste foi adicionado a 10 mL de Solução salina (cloreto de sódio 0,85% e cloreto de cálcio 10 mM), este foi centrifugado a 700 g durante 5 minutos (Centrifuga 5804R/Eppendorf/AG/Alemanha) (Figura 14). O sobrenadante foi retirado, ressuspendido em 10 mL de solução salina e centrifugado a cada ciclo. Ao final dos 3 ciclos, o plasma foi retirado em seguida e 2 mL do concentrado de hemácias foi transferido (infranadante) para uma proveta contendo 98 mL de solução tampão fosfato, obtendo-se então uma solução de eritrócitos a 2% (Figura 15).



Figura 14: Centrifuga

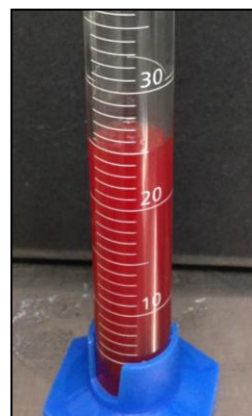


Figura 15: Solução Eritrocitária a 2%

As substâncias foram pesadas e acondicionadas em microtubos, obtendo-se: 1 mL de extrato de *L. ferrea* a 0,6%; 1 mL de enxaguatório de *L. ferrea* a 1% nos tempos 0, 30 e 60 dias; 1 mL de veículo do enxaguatório a 1% e 1 mL de clorexidina a 0,12%.

- Diluição das substâncias testes

As substâncias foram diluídas a fim de obter-se uma concentração única de 4 mg/mL em 500  $\mu$ L de solução salina (Figura 16).

- Extrato de *L. ferrea* (6 mg/mL) – Pesou-se a uma amostra de 334  $\mu$ L em 166  $\mu$ L de solução salina

- Enxaguatório de *L. ferrea* nos tempos 0, 30 e 60 dias (10 mg/mL) – 200  $\mu$ L em 300  $\mu$ L de solução salina.

- Veículo do enxaguatório (100 mg/mL) – 20  $\mu$ L em 480  $\mu$ L de solução salina.

- Clorexidina a 0,12% (12 mg/mL) - 167  $\mu$ L em 333  $\mu$ L de solução salina.



Figura 16: Diluição das substâncias testes

### - Preparo da placa

Os ensaios foram realizados em placas de 96 poços, nas quais em cada poço foi adicionado 100  $\mu$ L da substância teste diluída e 100  $\mu$ L de suspensão de eritrócitos a 2%, obtendo-se um volume final de 200  $\mu$ L em cada poço. A linha A correspondeu à Clorexidina a 0,12%, na linha B testou-se o Enxaguatório de *L. ferrea* no tempo 0, na linha C, o Enxaguatório de *L. ferrea* no tempo de 30 dias, na linha D, o enxaguatório de *L. ferrea* no tempo de 60 dias, na linha E, o Extrato de *L. ferrea* e na linha F, testou-se o Veículo do enxaguatório. Para controle positivo foi utilizado o Triton X a 0,2%, na linha G (que corresponde à indução de 100% de hemólise) e para controle negativo utilizou-se o DMSO, na linha H (Figura 17). A placa foi “equilibrada” com água destilada e as substâncias foram testadas em triplicata.

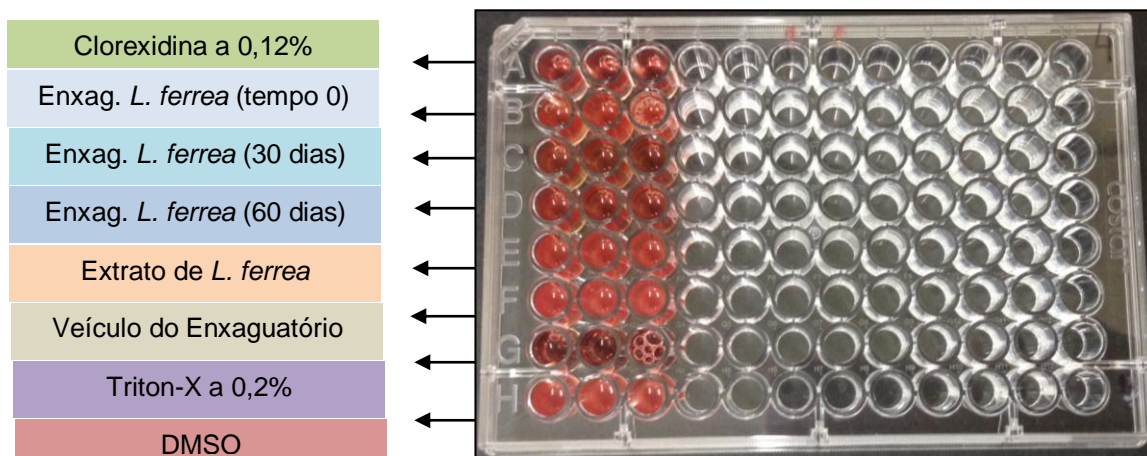


Figura 17: Preparo da placa

Como o jucá apresenta cor, necessitou-se realizar a leitura do branco em espectrofotômetro a 540 nm. Em seguida, a placa foi incubada (1 h/ 25°C) sob agitação constante e, posteriormente, centrifugada (900 g/ 10 min). Após a

leitura visual, transferiu-se o sobrenadante para outra placa e realizou-se a leitura em espectrofotômetro a 540 nm (Multimode Detector DTX 800 – Beckman Coulter). A completa hemólise foi obtida utilizando Triton X-100 a 0,2%. Menos de 10% de hemólise foi considerado como nível de efeito não tóxico.

#### 4.7. Cultura de células

##### - Ensaio em células

Foram utilizados fibroblastos MRC-5 (ensaio realizado na Faculdade de Ciências Farmacêuticas da UFAM).

As células MRC-5 foram cultivadas em meio DMEM suplementado (10% de soro fetal bovino, 2 mM de glutamina, 100 µg/mL de estreptomicina e 100 U/ml de penicilina). Todas as células foram incubadas a 37 °C e atmosfera úmida com 5% CO<sub>2</sub>, cultivadas em garrafas e manipuladas em fluxo laminar.

##### - Teste de citotoxicidade

A citotoxicidade dos produtos (enxaguatório de *L. ferrea* a 1% nos tempos 0, 30 e 60 dias, extrato de *L. ferrea* a 0,6%, veículo do enxaguatório a 1% e clorexidina a 0,12%) foi testada em fibroblastos murinos MRC-5, através do ensaio de Alamar Blue™ (AHMED et al, 1994).

Para os experimentos, as células foram semeadas em placas de 96 poços (2,5 x 10<sup>4</sup> células/ 100 µL/ poço) durante 24h, período necessário para que ocorresse a adesão das células à placa, incubadas a 37°C, com uma atmosfera de 5% de CO<sub>2</sub>. Em seguida, 100 µL dos produtos diluídos em meio

foram adicionados a cada poço, na concentração de 5  $\mu\text{L}/\text{mL}$ , e as células incubadas durante 72 h, nas mesmas condições ambientes. Os poços controles negativos receberam somente meio de cultura. O experimento foi realizado em triplicata. Três horas antes do final da incubação, 10  $\mu\text{L}$  de Alamar Blue™ 0,02% foi adicionado a cada poço. O sinal de fluorescência foi monitorado através de um leitor multiplaca usando comprimento de onda de excitação 530-560 nm e 590 nm de comprimento de onda de emissão (Figura 18). O sinal fluorescente gerado a partir do ensaio foi ser proporcional ao número de células vivas na amostra, de acordo com o ensaio.

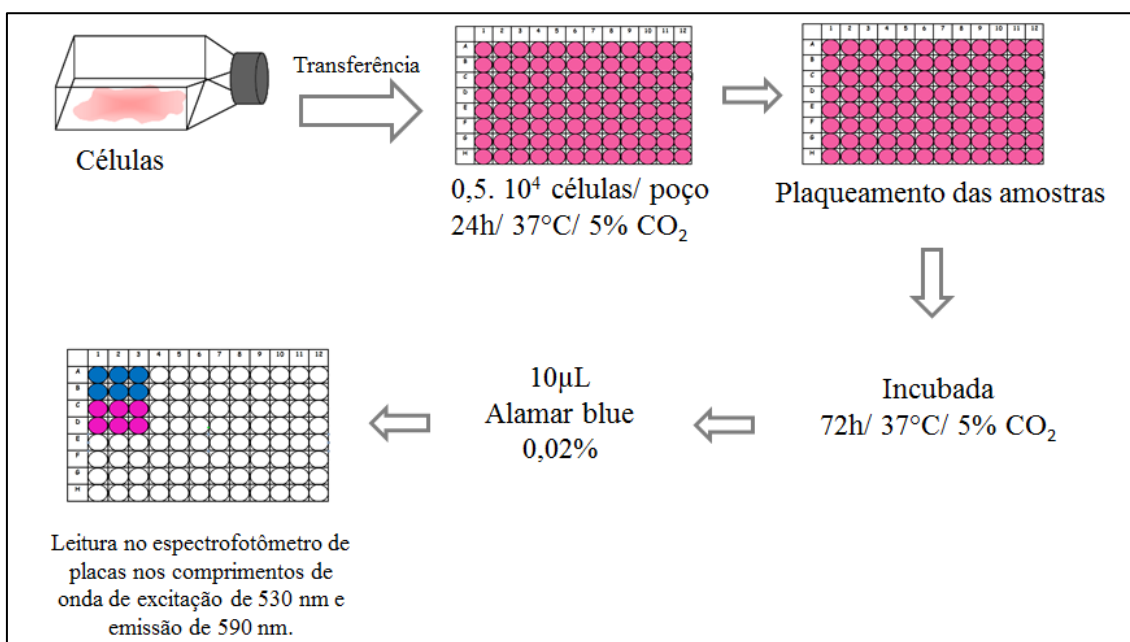


Figura 18: Esquema com o ensaio de Alamar Blue/ Ahmed et al (1994).

#### 4.8 Avaliação da microdureza do esmalte dentário

A avaliação quanto ao potencial erosivo da nova solução fitoterápica com a planta *L. ferrea* foi realizada por meio de um estudo experimental *in vitro*,

utilizando a metodologia de abordagem indutiva comparativa, adaptada de Moreira et al (2012), considerando as possíveis alterações qualitativas do esmalte dentário bovino exposto ao enxaguatório teste (Figura 19).

Foram selecionados 30 incisivos bovinos, os quais foram aleatoriamente divididos em 3 grupos (n=10): Grupo 1- controle negativo com água destilada; Grupo 2 - enxaguatório de Jucá; Grupo 3 - veículo do enxaguatório.

Os dentes foram limpos com curetas periodontais para a remoção de qualquer resíduo de tecido periodontal aderido à superfície dentária e foram armazenados em solução fisiológica (NUNES et al, 2012).

O seccionamento dos elementos dentários foi realizado por meio de uma máquina de corte (Mecatome/Presi/Grenoble-França) separando-se a porção coronária e radicular, sendo esta última desprezada. A coroa dentária foi seccionada paralelamente ao longo eixo, nos sentidos mesio-distal e vestibulo-lingual, de maneira tal que foram obtidos espécimes padronizados (4mm x 4mm x 2mm) (SCARAMUCCI et al, 2011).

Após obtenção dos blocos de esmalte, a superfície dentária foi planificada objetivando faces paralelas. Para isso, os blocos foram incluídos em resina acrílica autopolimerizável Vipi Flash (Vipi Ind. Com. Prod. Odontol. Ltda., Pirassununga, São Paulo, Brasil) com o lado do esmalte exposta e em seguida levados para uma politriz (AROTEC APL-4<sup>®</sup>), com lixa de granulação 240 em baixa rotação, sob refrigeração a água, num tempo de 10 segundos. Para lixamento e polimento da porção do esmalte, os blocos foram reposicionados com a área de esmalte voltada para cima e levados à politriz, com lixa de granulação de 600 por 5 segundos, em baixa velocidade e seguida por discos de feltro e solução diamantada para o acabamento final. Entre uma lixa e outra,

os blocos foram lavados em ultrassom, durante 2 minutos, utilizando água destilada e deionizada e, ao final, com solução detergente (BUEHLER®). Estes foram conservados posteriormente em ambiente úmido (MATUMOTO, 2008).

Os blocos foram numerados e a microdureza de superfície inicial foi mensurada com 3 endentações com 100 µm de distância entre elas realizadas próximas à região central de cada bloco, utilizando o microdurômetro Shimadzu HMV-2000, com um diamante Knoop que empregou um peso de 50g por 15 segundos (SCARAMUCCI et al, 2011).

Para a realização dos desafios erosivos cada grupo foi armazenado em recipiente individual, mantendo-se os corpos de prova totalmente submersos nas soluções pelo período de um minuto, seguido por três minutos em saliva artificial. O ciclo de imersão foi repetido duas vezes na tentativa de simular o hábito de utilização de enxaguatórios bucais, e ao final de cada ciclo os corpos de prova foram lavados com água destilada (adaptado de LINÑAN-DURAN et al, 2007).

Foram realizados dois ciclos de imersão, dois desafios diários, durante três dias consecutivos com intervalo de 12 horas entre eles, totalizando 24 minutos de exposição ao enxaguatório de Jucá. Todos os corpos de prova permaneceram em repouso entre os desafios, totalmente imersos em recipiente contendo água destilada. Ao final da última imersão, foi realizado o teste de microdureza (adaptado de MATUMOTO, 2008).

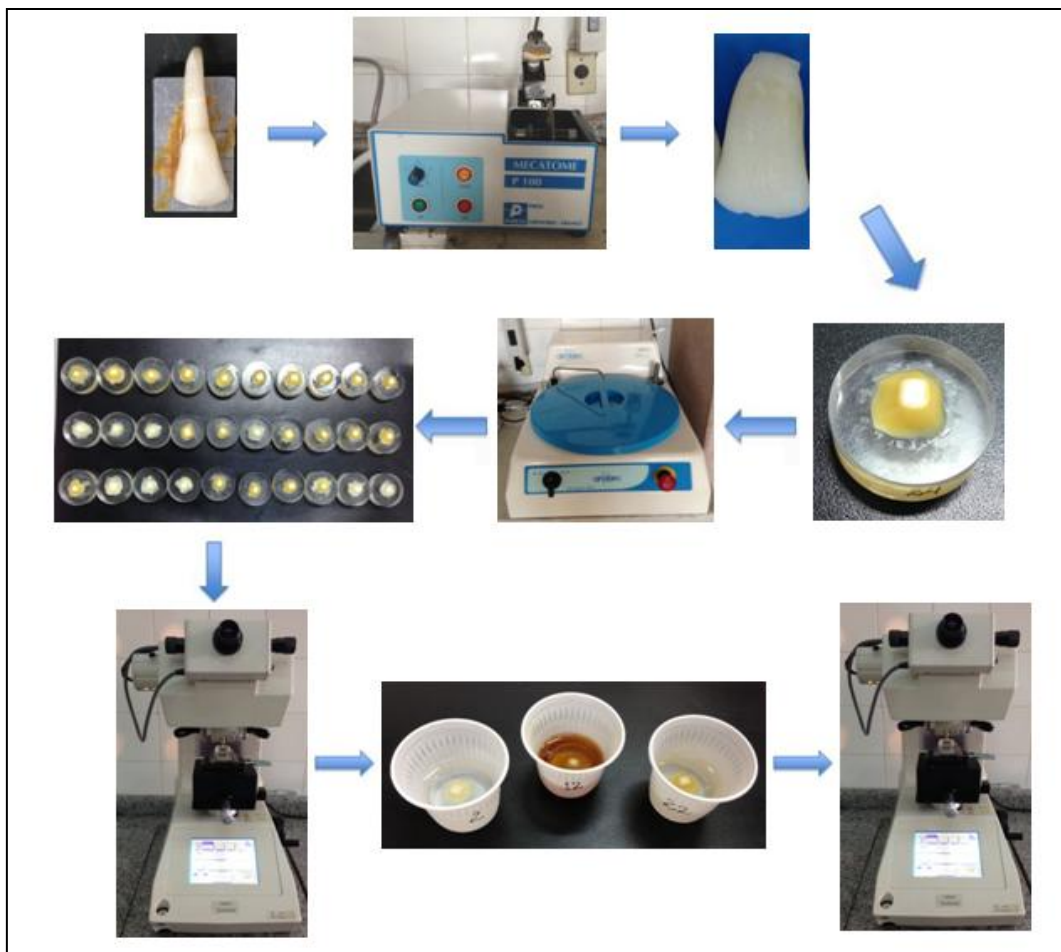


Figura 19: Esquema do teste de microdureza

A alteração de dureza foi obtida através da diferença entre as medidas iniciais e finais dos corpos de prova, em porcentagem de perda de dureza de superfície (%PDS) e a distribuição dos dados foi avaliada quanto à normalidade e homogeneidade, calculada pela fórmula:

$$\%PDS = \frac{\text{Dureza inicial} - \text{Dureza pós-experimento}}{\text{Dureza inicial}} \times 100$$



#### 4.9 Avaliação da alteração de cor do esmalte dentário

##### - Confeção dos corpos de prova

A confecção dos corpos de prova seguiu a metodologia proposta por Fushida e Cury (1999), adaptada para dentes bovinos.

Foram utilizadas 25 coroas de dentes bovinos hígidos. Após a extração, os dentes foram armazenados em timol a 2% por 24 horas para descontaminá-los (ARAÚJO et al, 1998). Em seguida, estes foram limpos com curetas periodontais para a remoção de qualquer resíduo de tecido periodontal aderido à superfície dentária e foram armazenados em solução fisiológica (Nunes et al, 2012).

Para a confecção dos corpos de prova, os dentes bovinos foram seccionados ao nível da junção amelo-cementária, separando-se a coroa da raiz, utilizando-se uma cortadeira (PRESI Mecatome, Grenoble-France, p100, 1992), ajustada com disco de diamante dupla face (Figuras 20, 21 e 22). Os corpos de prova foram armazenados em recipientes individuais contendo água deionizada e mantidos à temperatura de  $\pm 37^{\circ}\text{C}$ .



Figura 20: Dentes preparados para colocação na máquina de corte



Figuras 21 e 22: Dente bovino posicionado na cortadeira (PRESI Mecatome, Grenoble-France, p100, 1992, para o seccionamento dentário

A câmara pulpar foi limpa e preenchida por resina composta (Figura 23).  
Os espécimes foram armazenados em água deionizada a 37°C por 24 horas.



Figura 23: Selamento coronário com resina composta

Os corpos de prova foram distribuídos de acordo com os seguintes grupos experimentais:

- Grupo I (controle positivo) – 05 corpos de prova imersos em 3 mL de clorexidina a 0,12%, por 24 horas, divididos em 2 imersões de 12 horas cada.
- Grupo II – 05 corpos de prova imersos em 3 mL de veículo de *L. ferrea* por 24 horas, divididos em 2 imersões de 12 horas cada.

- Grupo III - 05 corpos de prova imersos em 3 mL de enxaguatório de *L. ferrea* por 24 horas, divididos em 2 imersões de 12 horas cada.
- Grupo IV - 05 corpos de prova imersos em 3 mL de extrato de *L. ferrea* por 24 horas, divididos em 2 imersões de 12 horas cada.
- Grupo V (controle negativo) - 05 corpos de prova imersos em 3 mL de água destilada por 24 horas, divididos em 2 imersões de 12 horas cada.

Anteriormente à imersão nas soluções testes foi realizada a leitura da cor dos dentes no tempo inicial (T1) de cada corpo de prova. A cor foi determinada através dos parâmetros do sistema CIE lab (Comissão Internacional da Iluminação -  $L^* a^* b^*$ ), no qual  $L^*$  indica a luminância, expressa em porcentagem (de 0 para o preto a 100 para o branco)  $a^*$  e  $b^*$  duas gamas de cor que vão respectivamente do verde ao vermelho e do azul ao amarelo com valores que vão de -120 a +120.

A mensuração objetiva da cor foi realizada através da utilização do aparelho espectrofotômetro VITAEasyshade (Easyshade<sup>®</sup>, Vivadente, Brea, CA, EUA) (Figura 24).



Figura 24: Aparelho Vita EasyShade<sup>®</sup> Compact  
Fonte: VITA Shade Assist 2.0

- Imersão dos corpos de prova nas soluções testes

Os corpos de prova foram imersos em 3 mL das substâncias testes por um período de 12 horas, tempo equivalente a 1 ano de uso diário (2 min/ dia) de enxaguatório bucal (GÜRGAN, ÖNEN e KÖPRÜLÜ, 1997).

As amostras foram mantidas à temperatura de  $\pm 37^{\circ}\text{C}$  e foram agitadas em uma mesa rotacional orbital (MA 140 CFT – Marconi Equipamentos, Piracicaba, São Paulo, Brasil) a cada 3 horas para que haja a homogeneização das soluções a 100rpm/ 10minutos (Figura 25). Após esse período os espécimes foram lavados abundantemente com água e submetidos à leitura da cor utilizando-se para a mensuração no espectrofotômetro (T2). Em seguida, os corpos de prova foram reimersos nas soluções por um período de 12 horas, totalizando 24 horas de imersão. Os espécimes foram então lavados abundantemente com água e submetidos à nova leitura da cor com o espectrofotômetro (T3), sob as mesmas condições experimentais.



Figura 25: Grupos I, II, III, IV e V posicionados no agitador Certomat<sup>®</sup> MO

Os grupos controle positivo e negativo foram igualmente testados após imersão em água destilada. A comparação da alteração da cor dos dentes antes e após as substâncias testes foi dada pela diferença de cor e foi representada pela equação:

$$\Delta E = [(\Delta L)^2 + (\Delta a)^2 + (\Delta b)^2]^{1/2}, \text{ onde:}$$

Parcial (T2 – T1)

$$\Delta L^*_{\text{parcial}} = L^{*2} - L^{*1} \rightarrow \text{leitura após o uso da solução (T2) menos a leitura prévia (T1)}$$

$$\Delta a^*_{\text{parcial}} = a^{*2} - a^{*1} \rightarrow \text{leitura após o uso da solução (T2) menos a leitura prévia (T1)}$$

$$\Delta b^*_{\text{parcial}} = b^{*2} - b^{*1} \rightarrow \text{leitura após o uso da solução (T2) menos a leitura prévia (T1)}$$

Final (T3 – T1)

$$\Delta L^*_{\text{final}} = L^{*3} - L^{*2} \rightarrow \text{leitura após o uso da solução (T3) menos a leitura prévia (T1)}$$

$$\Delta a^*_{\text{final}} = a^{*3} - a^{*2} \rightarrow \text{leitura após o uso da solução (T3) menos a leitura prévia (T1)}$$

$$\Delta b^*_{\text{final}} = b^{*3} - b^{*2} \rightarrow \text{leitura após o uso da solução (T3) menos a leitura prévia (T1)}$$

#### 4.10 Análise Estatística

Os resultados obtidos através da CIM, avaliação de contaminantes, estabilidade, sedimentação e teste de hemólise foram tabulados e descritos pela estatística descritiva.

Para o teste de cultura de células os resultados foram obtidos por regressão não-linear com valores de  $IC_{50}$  e intervalos de confiança de 95% (IC 95%).

Na avaliação do pH, densidade, microdureza e alteração de cor, os dados foram apresentados por meio de tabelas e gráficos, onde se calculou a média e o desvio-padrão (DP) para os dados quantitativos que apresentaram distribuição normal por meio do teste de *Kolmogorov - Smirnov*. Para os dados

que apresentaram distribuição normal e variâncias homogêneas (Teste de Bartlett's) foi aplicado o teste da Análise de Variância (ANOVA) e *Tukey* (ARANGO, 2001; VIEIRA, 2004).

O software utilizado na análise foi o Minitab versão 14 para Windows e o nível de significância fixado para aplicação dos teste foi de 5%.

## 5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

A necessidade de se avaliar meios alternativos e economicamente viáveis para o controle do biofilme dental com a ampliação deste benefício para um maior número de pessoas tem estimulado pesquisas de métodos complementares, como a Fitoterapia, dentro de programas preventivos e curativos importantes para a população mundial (BORGHI, MOIMAZ e SALIBA, 2005; BRASIL, 2006; BRASIL, 2008; MARINHO e ARAÚJO, 2007; MORAN, ADDY e ROBERTS, 1992; PALOMBO, 2011; ROSA, MAIA e GALLO, 2010; SANTOS et al, 2010).

A abrangência da utilização de fitoterápicos é vasta e engloba fins variados, sobretudo em relação à saúde bucal. A eficácia de tais plantas empregadas em enxaguatórios bucais tem sido investigada para o tratamento de cárie e doença periodontal, e os resultados sugerem que tais princípios ativos podem ser utilizados como apoio à terapia de tais afecções bucais e como profilaxia de rotina (CORDEIRO et al, 2006; FREIRES et al, 2010).

O uso de enxaguatórios antimicrobianos como tratamento adjunto aos meios mecânicos de controle de biofilme dental e inflamação gengival está bem estabelecido (ANDRADE et al, 2011; GUNSOLLEY, 2010; MARSH, 2010). Segundo Vieira (2005), os componentes principais da formulação de um enxaguatório bucal são: diluente (água deionizada), neutralizador de pH (hidróxido de sódio), flavorizante (menta).

Nesse contexto, Conde (2006) e Sampaio et al (2009) realizaram estudos com extratos da espécie vegetal *L. ferrea* e os resultados demonstraram um grande potencial do Jucá sobre micro-organismos do biofilme dental, assim, Marreiro (2011) e Marreiro et al (2014) propuseram o

uso do extrato da vagem desta planta como enxaguatório bucal, incorporando à formulação, o extrato do vegetal liofilizado obedecendo a CIM.

Desta forma, o presente estudo teve a finalidade de aprimorar a formulação de um enxaguatório bucal à base de extrato da espécie vegetal *L. ferrea*, podendo este servir tanto na prevenção quanto no tratamento de doenças bucais.

Segundo Vieira (2005), deve ser avaliado o grau de solubilidade do extrato de maneira que haja dissolução total do mesmo no diluente. Caso seja necessário, pode-se utilizar outro agente diluente para permitir a completa dissolução do soluto, justificando, assim, o uso do Tween 20 e do Tween 80 na formulação apresentada nesta pesquisa.

A formulação proposta não contém solução alcoólica visto que alguns autores consideram o álcool como agente irritante à mucosa bucal (MAEKAWA et al, 2010). Entretanto, Borges et al (2010) afirmaram que os enxaguatórios sem álcool não têm a mesma eficácia antimicrobiana comparada aos enxaguatórios com álcool em relação aos micro-organismos *S. aureus*, *C. albicans*, *E. faecalis* e *P. aeruginosa*.

A avaliação da atividade antibacteriana do enxaguatório de *L. ferrea* frente a cepas de *S. mutans*, *S. oralis*, *S. salivarius*, *L. casei* e *C. albicans*, utilizando o teste de microdiluição em microplaca para determinar a CIM (NCCLS, 2003; Andrews et al, 2001 e adaptação de Sampaio, 2009) mostrou que o enxaguatório apresentou atividade antibacteriana bactericida frente a todos os micro-organismos testados nas concentrações de 0,55 mg/mL; 0,6 mg/mL e 0,65 mg/mL para o *S. mutans* (Figuras 26 e 27), *S. oralis* (Figuras 28 e 29) e *S. salivarius* (Figuras 30 e 31) e de 0,25 mg/mL para o *L. casei* (Figuras



32 e 33) e a *C. albicans* (Figuras 34 e 35), correspondendo às seguintes concentrações de extrato nos devidos poços de 0,041 mg/mL, 0,045 mg/mL, 0,048 mg/mL e 0,018 mg/mL, respectivamente (Tabela 4).

Micro-organismos	CIM (mg/mL) bactericida				
	Enxaguatório de <i>L. ferrea</i>	Extrato de <i>L. ferrea</i>	CHX 0,12%	Veículo	NaOH 10%
<i>S. mutans</i>	0,55	0,041	0,3	-	2,5
<i>S. oralis</i>	0,6	0,045	0,3	-	2,5
<i>S. salivarius</i>	0,65	0,048	0,3	-	2,5
<i>L. casei</i>	0,25	0,018	0,3	49,5	2,5
<i>C. albicans</i>	0,25	0,018	0,3	24,75	2,5

Tabela 4: Valores da CIM (mg/mL) bactericida das substâncias testadas frente aos micro-organismos.

O enxaguatório de *L. ferrea* apresentou atividade bacteriostática na concentração de 0,3 mg/mL frente a *S. mutans*, *S. oralis* e *S. salivarius*, correspondendo à concentração de 0,022 mg/mL de extrato (Tabela 5).

O veículo do enxaguatório de *L. ferrea* apresentou atividade bactericida frente ao *L. casei* e à *C. albicans*, nas concentrações de 49,5 mg/mL e 24,75 mg/mL, respectivamente e atividade bacteriostática frente ao *S. oralis*, *S. salivarius* e *L. casei* nas concentrações de 79,2 mg/mL, 59,4 mg/mL e 29,7 mg/mL, respectivamente, não apresentando qualquer atividade frente ao *S. mutans* (Tabelas 4 e 5).

Micro-organismos	CIM (mg/mL) bacteriostática				
	Enxaguatório de <i>L. ferrea</i>	Extrato de <i>L. ferrea</i>	CHX 0,12%	Veículo	NaOH 10%
<i>S. mutans</i>	0,3	0,022	-	-	-
<i>S. oralis</i>	0,3	0,022	-	79,2	-
<i>S. salivarius</i>	0,3	0,022	-	59,4	-
<i>L. casei</i>	-	-	-	29,7	-
<i>C. albicans</i>	-	-	-	-	-

Tabela 5: Valores da CIM (mg/mL) bacteriostática das substâncias testadas frente aos micro-organismos.

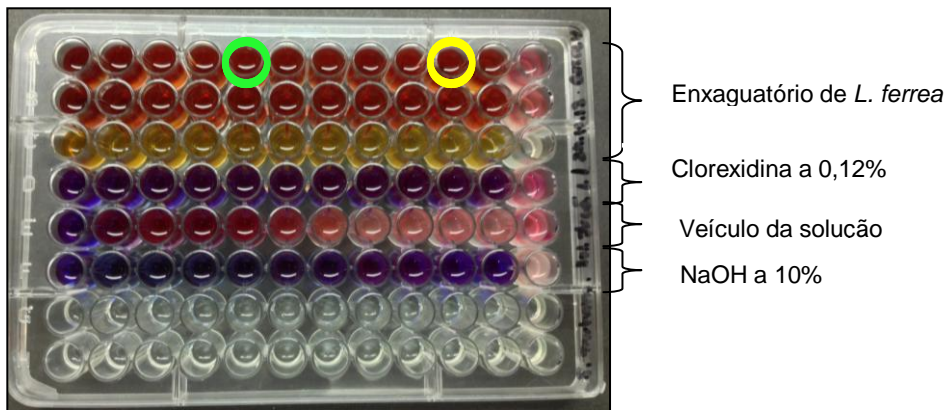


Figura 26: CIM bactericida do enxaguatório de *L. ferrea* no poço A5 e CIM bacteriostática no poço A10 frente ao *S. mutans*.

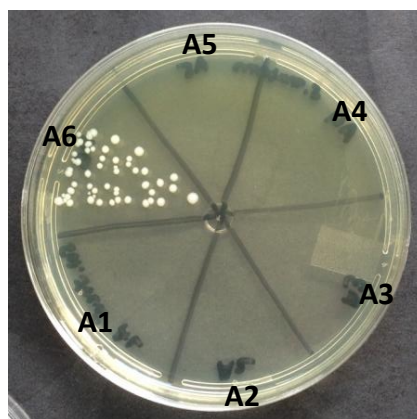


Figura 27: Plaqueamento das linhas A1 a A6 da microdiluição do enxaguatório de *L. ferrea* frente ao *S. mutans*.

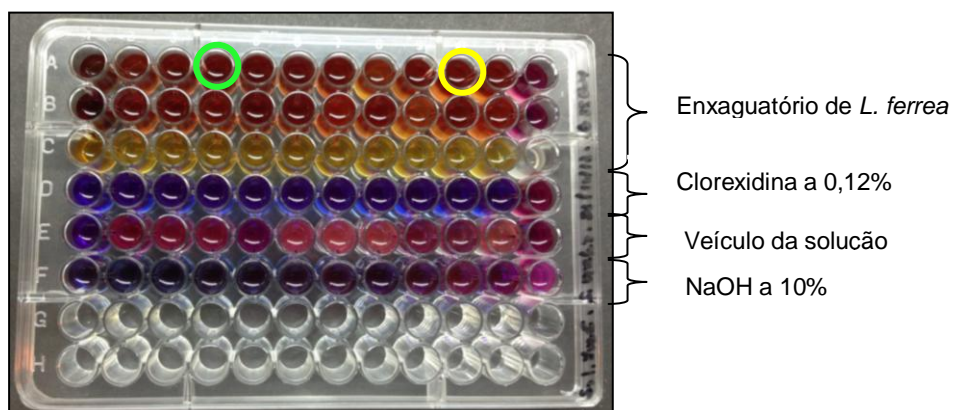


Figura 28: CIM bactericida do enxaguatório de *L. ferrea* no poço A4 e CIM bacteriostática no poço A10 frente ao *S. oralis*.

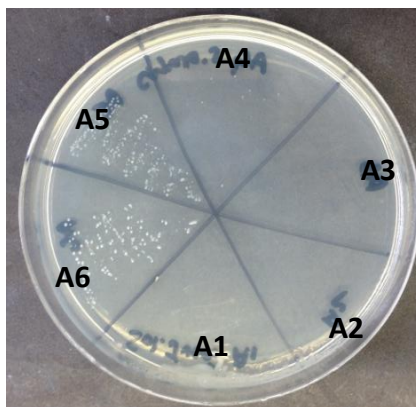


Figura 29: Plaqueamento das linhas A1 a A6 da microdiluição do enxaguatório de *L. ferrea* frente ao *S. oralis*.

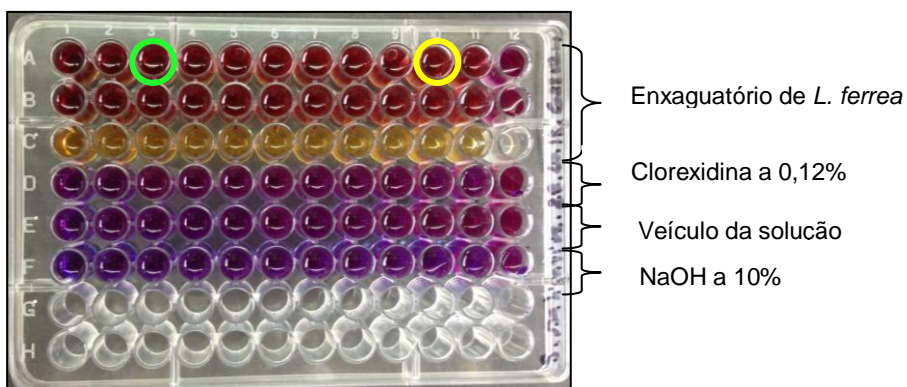


Figura 30: CIM bactericida do enxaguatório de *L. ferrea* no poço A3 e CIM bacteriostática no poço A10 frente ao *S. salivarius*.

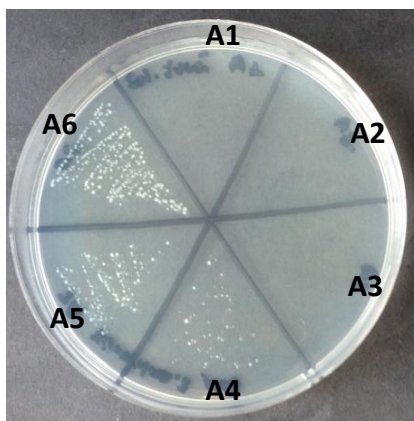


Figura 31: Plaqueamento das linhas A1 a A6 da microdiluição do enxaguatório de *L. ferrea* frente ao *S. salivarius*.

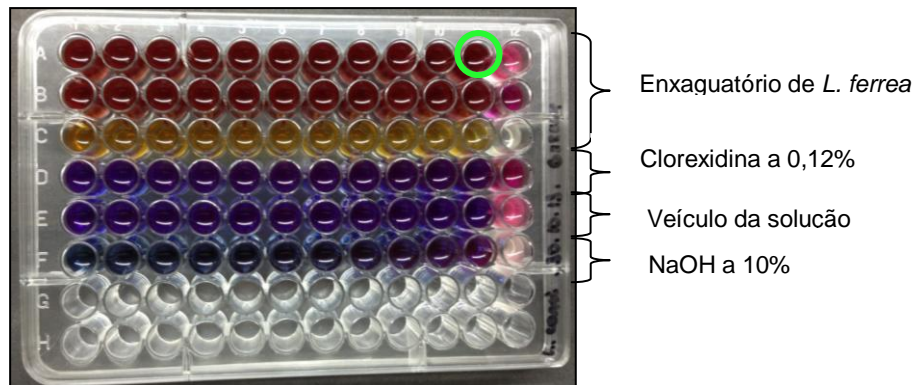


Figura 32: CIM bactericida do enxaguatório de *L. ferrea* no poço A11 frente ao *L. casei*.

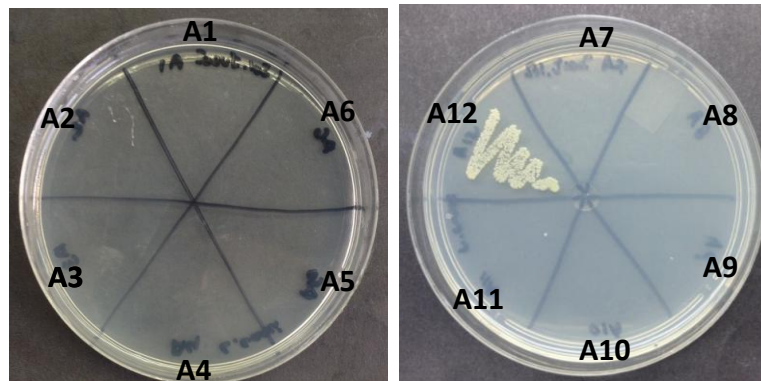


Figura 33: Plaqueamento das linhas A1 a A12 da microdiluição do enxaguatório de *L. ferrea* frente ao *L. casei*.

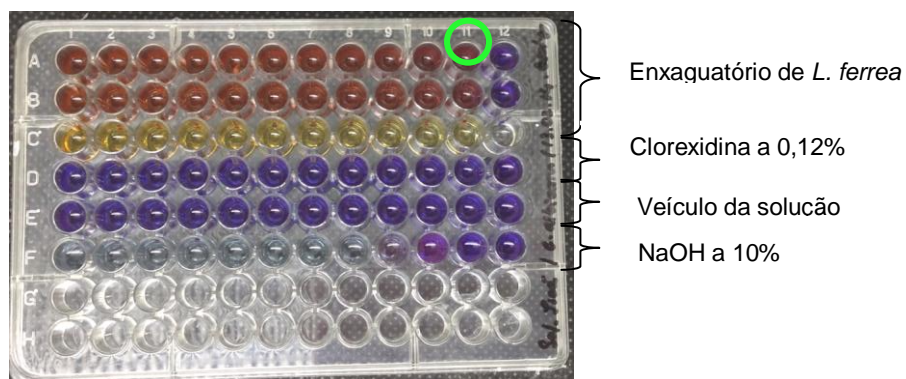


Figura 34: CIM fungicida do enxaguatório de *L. ferrea* no poço A11 frente à *C. albicans*.



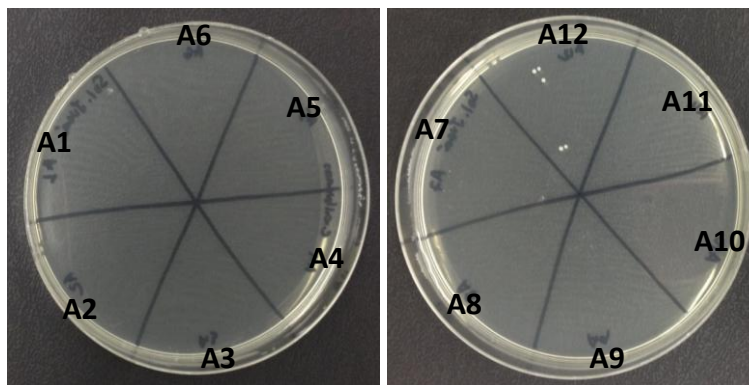


Figura 35: Plaqueamento das linhas A1 a A12 da microdiluição do enxaguatório de *L. ferrea* frente à *C. albicans*.

Sampaio et al (2009) pesquisaram a atividade antimicrobiana *in vitro* do extrato da fruta de *L. ferrea* frente aos mesmos patógenos bucais, utilizando a mesma metodologia do presente estudo, concluindo que o extrato foi efetivo contra os micro-organismos testados nas concentrações de 0,04 mg/mL, 0,1 mg/mL, 0,066 mg/mL, 0,066 mg/mL e 0,025 mg/mL, para *S. mutans*, *S. oralis*, *S. salivarius*, *L. casei* e *C. albicans*, respectivamente, ou seja, apresentando resultados que corroboram com o presente trabalho, somente com relação ao *S. mutans*.

Marreiro (2011) pesquisou um enxaguatório à base de *L. ferrea*, utilizando a mesma metodologia do presente estudo, tendo como resultado atividade antibacteriana bactericida frente às cepas de *S. mutans*, *S. oralis* e *L. casei*, com CIM nas concentrações de 4,375 mg/mL, 3,750 mg/mL e 4,375 mg/mL, respectivamente, porém, frente ao *S. salivarius* nem o extrato nem o enxaguatório de jucá apresentaram atividade antimicrobiana, diferentemente dos resultados encontrados nesta pesquisa, onde o enxaguatório de *L. ferrea*

apresentou atividade bactericida e bacteriostática frente a esse micro-organismo.

Conde (2006) avaliou a atividade antibacteriana de plantas da Amazônia, incluindo o jucá, através da determinação da CIM por difusão em meio sólido para o *S. mutans* e *L. casei* e a CIMA, com diluições dos extratos de 1:1 a 1:512, para o *S. mutans*, *S. oralis*, *S. salivarius*, *L. casei* e *C. albicans*. O jucá apresentou halos de inibição de 22 e 21 mm quando testado em uma concentração de 500 mg/mL e halos de 15 mm quando em uma concentração de 62,5 mg/mL (1:8) para o *S. mutans* e o *L. casei*, respectivamente, e a CIMA dos mesmos micro-organismos foi de 1:16.

A *C. albicans* foi o micro-organismo mais susceptível na presente pesquisa, pois todas as substâncias testes tiveram ação fungicida frente a essa levedura, em todas as concentrações testadas, sugerindo-se assim o potencial uso do extrato de *L. ferrea* no tratamento de condições infecciosas como candidíase e estomatite protética.

Alves et al (2008) e Teixeira et al (2011) concordaram que, embora o método de diluição em caldo seja uma excelente opção para se determinar a atividade antimicrobiana, fatores primários, tais como a sensibilidade do organismo, o diluente utilizado, o estágio e a taxa de crescimento do micro-organismo, condições de incubação e disponibilidade de oxigênio têm influência nos valores de CIM, sendo de grande importância o conhecimento das condições experimentais e padronização rigorosa na execução do teste.

A clorexidina a 0,12% e o NaOH a 10% apresentaram atividade antimicrobiana bactericida frente a todas as cepas testadas, em todas as concentrações.

Corroborando com os achados do presente estudo, onde a clorexidina a 0,12% apresentou CIM de 0,3 mg/ mL frente a todos os micro-organismos, a pesquisa de Andrade et al (2011) encontraram o mesmo resultado frente ao *S. mutans* e à *C. albicans*. Entretanto, Maekawa et al (2010), avaliaram diferentes formulações de CHX a 0,12%, utilizando metodologia similar à empregada no presente trabalho e os autores obtiveram como resultado CIM entre 0,39 e 0,19 mg/ mL frente à *C. albicans*.

Os compostos oriundos do metabolismo secundário são os responsáveis pelos efeitos medicinais ou tóxicos das plantas (MAZID et al, 2011). Dentre as hipóteses sobre os mecanismos da ação antimicrobiana dos taninos destacam-se a inibição de enzimas, a modificação do metabolismo celular pela atuação nas membranas e a complexação com íons metálicos com consequente diminuição da sua disponibilidade para o metabolismo dos micro-organismos (MELLO e SANTOS, 2002). Semelhantemente, esta afinidade dos polifenóis por proteínas desempenha um importante papel na inativação de enzimas, impedindo assim o crescimento de alguns micro-organismos (HASLAM, 1996).

Nesse contexto, Trentin et al (2013) propôs que os taninos obtidos de plantas da Caatinga são capazes de inibir a formação de biofilme por danificar a membrana bacteriana, exibindo assim propriedades bacteriostáticas, o que poderia justificar a atividade bactericida e fungicida da planta *L. ferrea*, por também apresentar taninos como componentes majoritários em sua composição (UEDA et al, 2001).

Pereira et al (2009) enfatizam que a demonstração da propriedade antimicrobiana dos extratos das plantas utilizadas em sua pesquisa, frente às cepas padrões foi relevante porque as cepas testadas são de micro-

organismos que estão associados com patologias que acometem a cavidade bucal e geralmente são utilizadas em pesquisas para análise de atividade antimicrobiana. No entanto, como estes resultados se aplicam somente a estas cepas padrões, posteriores estudos devem abordar cepas resistentes e assim ampliar a pesquisa para o desenvolvimento de novos antimicrobianos necessários para combater micro-organismos resistentes.

Todo medicamento fitoterápico deve ser submetido a testes de estabilidade da formulação, segundo as resoluções RDC 017/2000, RDC 010/2001 e RE 560/2002 e RDC 13/2013, da ANVISA (AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA, 2000, 2001, 2002 e 2013). Desta forma, de acordo com o estudo preliminar realizado com o extrato bruto de *L. ferrea* por Marreiro et al (2008), o melhor local preservando a estabilidade do produto em teste foi à temperatura em torno de 24 a 26 °C. Sendo assim, os testes de caracterização da formulação do enxaguatório foram realizados somente com a solução armazenada a essa temperatura, seguindo a mesma linha de pesquisa de Marreiro (2011).

A avaliação das características organolépticas indicou que não ocorreram modificações de cor, odor, brilho ou consistência do enxaguatório de *L. ferrea* nos tempos testados (0, 30 e 60 dias), com coloração do enxaguatório marrom escuro, odor agradável e o aspecto homogêneo. Tal resultado também foi obtido nos estudos de Marreiro (2011), analisando uma solução à base da mesma planta. Enquanto que Simões e Bandeira (2004) avaliaram os caracteres organolépticos de um gel à base de copaíba e os resultados indicaram que, na maioria das amostras testadas, não houve qualquer modificação ao longo do tempo.



Isaac et al (2008) destacam que o aspecto de um fitocosmético, em relação à homogeneidade e coloração do produto, é importante do ponto de vista comercial, uma vez que pode influenciar a compra, por parte do consumidor, que não se sente atraído pela aparência do produto.

No teste de sedimentação não foi observada sedimentação do enxaguatório de *L. ferrea* em nenhum dos três períodos experimentais testados (0, 30 e 60 dias) quando submetidos à centrifugação, revelando desta forma que a formulação é totalmente solúvel, pois não houve separação de fases ou precipitação de sedimentos (Figura 36). Tal resultado corroborou com os estudos de Marreiro (2011), onde foi realizado o mesmo experimento utilizando uma formulação à base de extrato de *L. ferrea*, não havendo separação de fases, e também com os estudos de Simões e Bandeira (2004), que pesquisaram um gel à base de copaíba, não sendo observada a sedimentação do gel após centrifugação, embora Isaac et al (2008) afirmem que a não ocorrência de separação de fases não assegura sua estabilidade, somente indica que o produto pode ser submetido, sem necessidade de reformulação, aos testes de estabilidade.

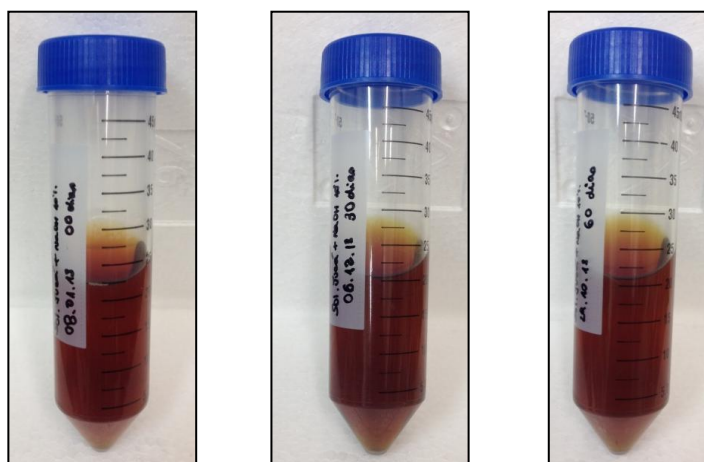


Figura 36: Tubos falcon contendo o enxaguatório de *L. ferrea* após teste de sedimentação nos tempos experimentais de 0, 30 e 60 dias

Os resultados das análises de pH e densidade do enxaguatório de *L. ferrea*, nos períodos experimentais (0, 30 e 60 dias) estão expressos na tabela 6 e gráficos 1 e 2.

Variável/Tempo	n	Média	Dp	p*
<b>pH</b>				<b>0,001</b>
0 dia	3	6,21a	0,07	
30 dias	3	6,15a	0,09	
60 dias	3	5,85b	0,03	
<b>Densidade (g/L)</b>				<b>&lt;0,001</b>
0 dia	3	1,035a	0,00	
30 dias	3	1,033a	0,00	
60 dias	3	1,029b	0,00	

Tabela 6: Distribuição segundo a média do pH e da densidade do enxaguatório de *L. ferrea* nos tempos (0, 30 e 60 dias).

Dp = desvio-padrão; \* ANOVA.

Letras distintas indicam diferença estatística ao nível de 5% de significância (teste de Tukey).

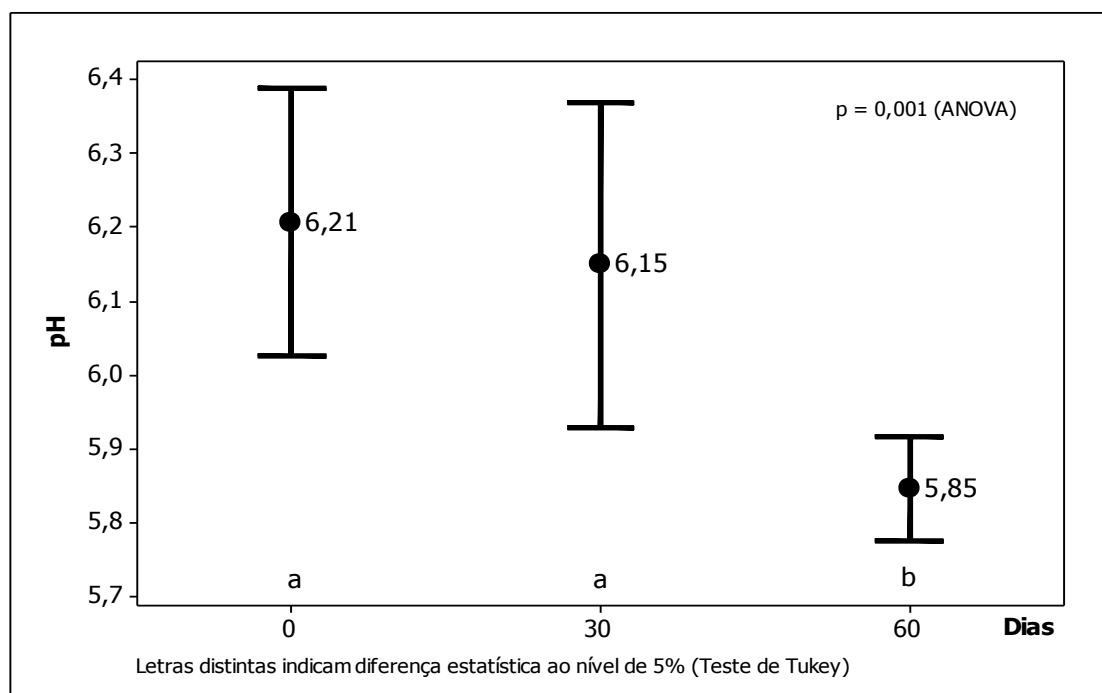


Gráfico 1: Distribuição segundo a média do pH do enxaguatório de *L. ferrea* nos tempos (0, 30 e 60 dias).

Analisando a tabela 6 e o gráfico 1, observou-se que o enxaguatório de *L. ferrea* apresentou valores médios de pH de 6,21, 6,15 e 5,85 nos tempos 0, 30 e 60 dias, respectivamente. Houve estabilidade dos valores médios de pH nos tempos 0 e 30 dias, porém houve diferença nos tempos de 0 e 60 dias e 30 e 60 dias, estatisticamente significativa, ao nível de 5%, quando realizado o teste de *Tukey*. Nos resultados obtidos por Marreiro (2011), também houve uma diminuição dos valores médios de pH do enxaguatório de jucá testado, no decorrer do experimento, havendo uma diferença de pH estatisticamente significativa, ao nível de 5%, entre os períodos de 0 e 60 dias, no entanto, nos períodos de 0 a 30 dias e de 30 a 60 dias essa diferença estatística não foi observada quando realizado o teste de *Tukey*, ficando o pH da formulação em torno de 5,5, considerado crítico para a desmineralização do esmalte.

Tal diferença pode ser explicada pela adição do NaOH a 10% na formulação do enxaguatório de *L. ferrea* do presente estudo, funcionando como agente alcalinizante e tamponante, alcançando o objetivo de deixar o pH compatível para o uso da formulação como enxaguatório, como proposto por Rowe, Shekskey e Weller (2003). Tal proposição foi seguida por Zanin et al (2007), que desenvolveram um enxaguatório bucal à base de extrato hidroalcoólico de *Salvia officinalis* L. e utilizaram o NaOH a 20% na sua formulação, estabilizando o pH em torno de 6,3.

A concentração utilizada de NaOH foi de 10% devido ao fato de o NaOH a 20% ter causado um escurecimento do enxaguatório de *L. ferrea*.

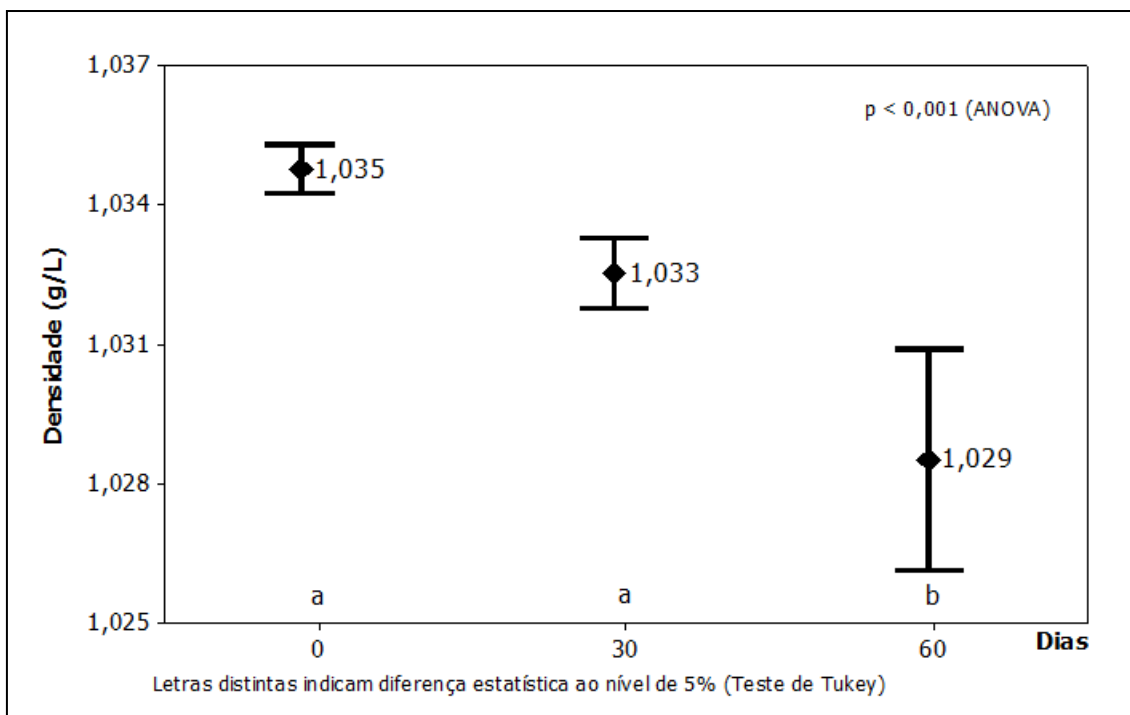


Gráfico 2: Distribuição segundo a média da Densidade (g/ L) do enxaguatório de *L. ferrea* nos tempos (0, 30 e 60 dias).

Quanto à densidade, verificou-se que a variação mostrou-se aceitável nos períodos experimentais (0, 30 e 60 dias), como pode ser observado na tabela 6 e no gráfico 2, havendo diferença estatística ao longo do tempo, quando realizado o teste de *Tukey*, somente nos períodos de 0 a 60 e de 30 a 60 dias, porém sem interferir na característica final da formulação. Os resultados encontrados por Marreiro (2011), utilizando um enxaguatório de jucá mostrou que houve variação dos valores de densidade, decrescendo nos períodos experimentais, havendo diferença estatística nos períodos de 0 a 60 dias e permanecendo sem diferença estatística de densidade nos períodos referentes a 0 e 30 dias e 30 a 60 dias quando realizado o teste de *Tukey*, sugerindo que estas variações podem ter ocorrido devido a perda de água ou mesmo pela volatilidade do enxaguatório, como descrito por Isaac et al (2008).

O teste microbiológico empregado visou verificar a presença de contaminantes no enxaguatório de *L. ferrea*. Nas condições e meios de culturas testados, não houve indicação da presença de micro-organismos (bactérias, fungos ou leveduras) (Figuras 37, 38, 39, 40 e 41).

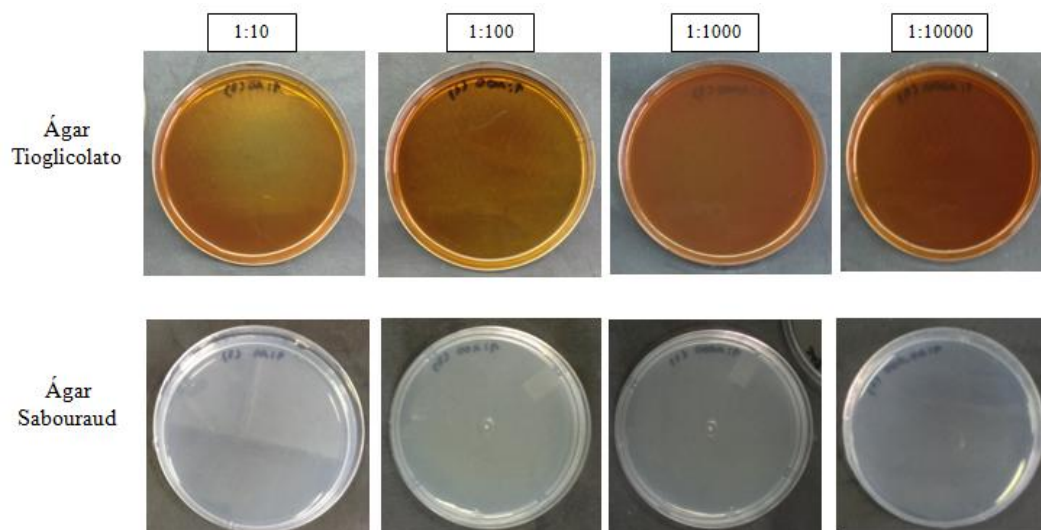


Figura 37: Avaliação microbiológica para a contagem total de micro-organismos

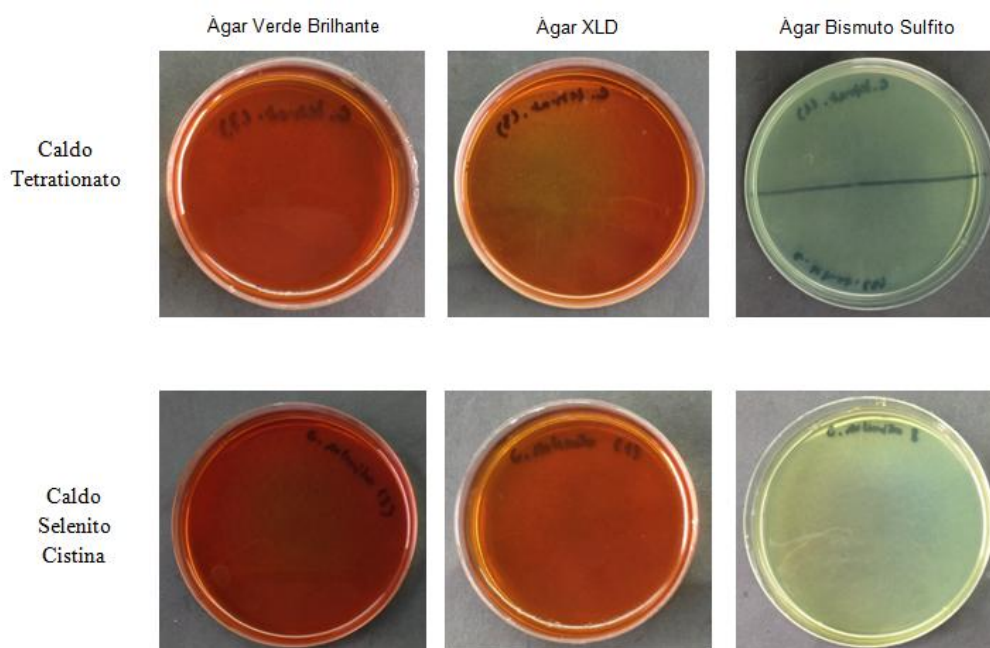
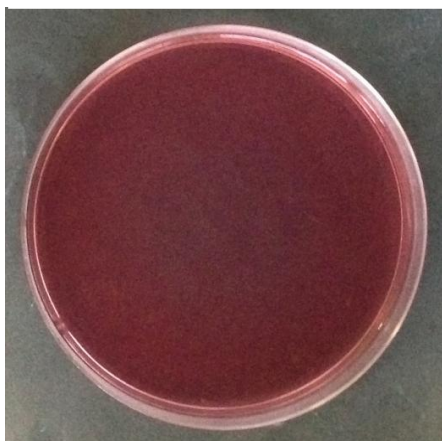
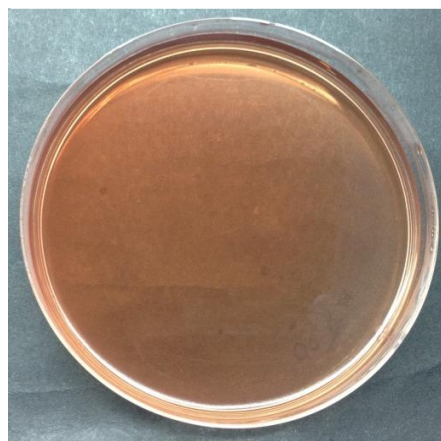


Figura 38: Avaliação microbiológica para a pesquisa de *Salmonella* sp.

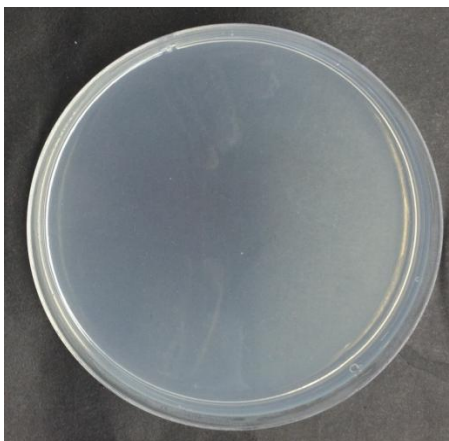
Ágar Macconkey

Figura 39: Pesquisa de *E. coli*

Ágar Vogel Johnson

Figura 40: Pesquisa de *S. aureus*

Ágar Cetrimida

Figura 41: Pesquisa de *P. aeruginosa*

Tais resultados estão de acordo com os resultados obtidos por Marreiro (2011), que estudou uma solução de *L. ferrea*, e Simões e Bandeira (2004), que estudaram um gel à base de copaíba, não havendo contaminação para nenhum dos micro-organismos testados, portanto, respeitando o que está preconizado pela ANVISA.

Pelissari (2008) afirmou que a pesquisa de contaminantes (controle microbiológico) tem como finalidade determinar o número total de micro-organismos presentes em preparações não estéreis, cosméticos e drogas

vegetais, existindo assim padrões pré-estabelecidos pela Organização Mundial de Saúde que tornam aceitáveis a contaminação por bactérias e fungos, desde que em um nível não muito alto, e a ausência ou presença reduzida dos micro-organismos com potencial patogênico. Dessa forma, torna-se de suma importância a identificação de micro-organismos patogênicos, tais como *Salmonella* sp., *E. coli*, *S. aureus* e *P. aeruginosa*, que não devem estar presentes assegurando assim a utilização de produtos de boa qualidade, seja ele de qualquer origem.

Para a padronização de produtos fitoterápicos, o estudo de estabilidade é de suma importância, pois a instabilidade pode modificar três quesitos essenciais: qualidade, eficácia e segurança. A estabilidade mostra o tempo pelo qual o fármaco retém sua integridade e pode ser afetada por fatores como temperatura, pH, luminosidade e ar (FERREIRA e SOUZA, 2007).

No processo de avaliação de uma formulação é importante realizar também ensaios toxicológicos para a verificação da segurança e o risco/benefício do possível uso terapêutico (EVANS, 2009; NÓBREGA et al, 2008). Dessa forma, no presente estudo foram realizados ensaios de citotoxicidade com o enxaguatório de *L. ferrea* nos tempos (0, 30 e 60 dias), com o extrato da planta, com o veículo do enxaguatório e com a clorexidina a 0,12%, através dos testes de hemólise e cultura de células.

No teste de hemólise avaliou-se a capacidade das substâncias testes em causar ou não lesões na membrana plasmática da célula, verificando-se que o enxaguatório de *L. ferrea* não apresentou atividade hemolítica nos tempos experimentais, porém o veículo e a clorexidina a 0,12% causaram hemólise com  $CE_{50}$  de 300,5 e 75,14  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , respectivamente (Figura 42 e Tabela 7). Tal



resultado é considerado satisfatório visto que a concentração do veículo na formulação do enxaguatório é inferior à concentração efetiva de hemólise ( $CE_{50}$ ).

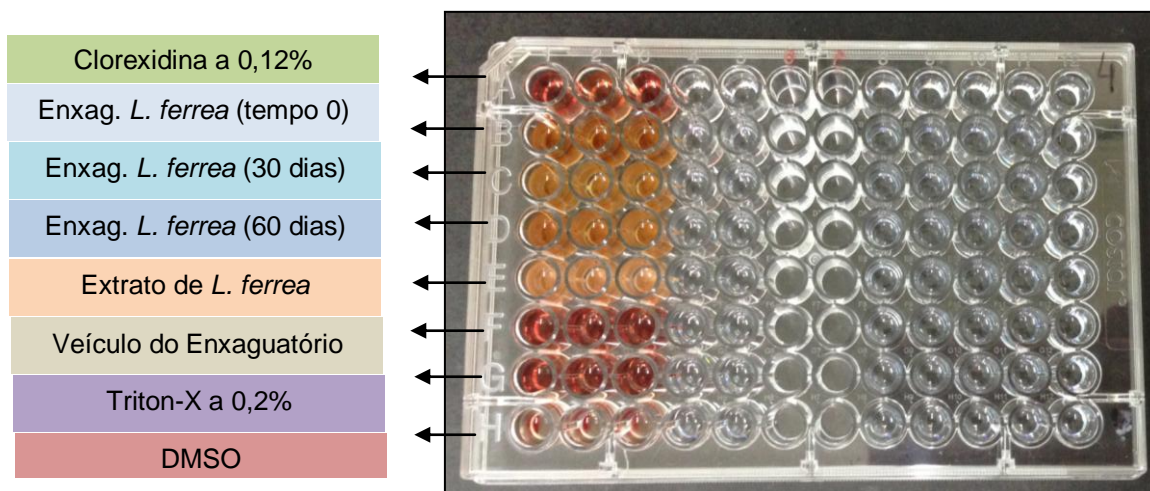


Figura 42: Teste de hemólise

Substância	Valores de $CE_{50}$ ( $\mu\text{g}/\text{mL}$ )
Clorexidina a 0,12%	75,14 (69,83 - 80,86)
Enxaguatório de <i>L. ferrea</i> (tempo 0)	> 2000
Enxaguatório de <i>L. ferrea</i> (30 dias)	> 2000
Enxaguatório de <i>L. ferrea</i> (60 dias)	> 2000
Extrato de <i>L. ferrea</i>	> 2000
Veículo do Enxaguatório	300,5 (259,1 - 348,6)

Tabela 7: Resultados do Teste de hemólise após análise estatística da  $CE_{50}$  ( $\mu\text{g}/\text{mL}$ )

Resultados diferentes foram obtidos por Marreiro (2011), após analisar o extrato de jucá, o veículo e a formulação do enxaguatório da planta, pois os produtos testes apresentaram uma baixa porcentagem de hemólise. Para o extrato de jucá, na maior concentração testada (300  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ), a porcentagem de hemólise apresentou uma média de 5,99% +/- 3,21. Já para o veículo (30  $\mu\text{L}/\text{mL}$ ) e a formulação comercial de enxaguatório de jucá (10  $\mu\text{L}/\text{mL}$ ) essa média foi de, respectivamente, 5,99% +/- 3,21 e 14,44% +/- 9,72.



Almeida (2001) e Faria Júnior (2005) afirmaram que a clorexidina é pouco tóxica, porém apresenta efeitos colaterais que dificultam o seu uso por um tempo prolongado. Entretanto, Rajabalian et al (2009) estudaram os efeitos citotóxicos dos enxaguatórios pérsica e clorexidina sobre linhagens de culturas de células de rato e humana, concluindo que ambos são tóxicos para os macrófagos, células epiteliais, fibroblastos, osteoblastos e células de uma forma dependente da concentração utilizada.

No teste de cultura de células pelo método de Alamar Blue™ foram avaliadas a viabilidade das células frente ao enxaguatório de *L. ferrea* nos tempos (0, 30 e 60 dias), do extrato, do veículo e da clorexidina a 0,12%. O tratamento correspondeu ao período de 72 horas em cultura de fibroblastos (MRC-5). Após a análise dos resultados foi possível verificar que nenhuma amostra testada foi capaz de induzir efeito citotóxico quando em contato com as células, apresentando valores de  $CI_{50}$  (Concentração Inibitória) acima de 50  $\mu\text{g}/\text{mL}$  (Tabela 8).

<b>Substância</b>	<b>Valores de <math>CI_{50}</math> (<math>\mu\text{g}/\text{mL}</math>)</b>
Clorexidina a 0,12%	> 50
Enxaguatório de <i>L. ferrea</i> (tempo 0)	> 50
Enxaguatório de <i>L. ferrea</i> (30 dias)	> 50
Enxaguatório de <i>L. ferrea</i> (60 dias)	> 50
Extrato de <i>L. ferrea</i>	> 50
Veículo do Enxaguatório	> 50

Tabela 8: Resultados do Teste de citotoxicidade pelo Alamar Blue™

$CI_{50}$  – Concentração Inibitória  
Análise estatística e valores de  $CI_{50}$  obtidas por Regressão não linear/  
Programa GraphPad Prism 5.0.

Os resultados obtidos por Marreiro (2011) no que se refere ao teste de citotoxicidade utilizando a mesma metodologia do presente estudo verificou que ambos (o enxaguatório e o veículo da formulação) apresentaram-se citotóxicos, ocasionando morte dos fibroblastos, tendo o enxaguatório apresentado viabilidade celular de 8% e o veículo de 7% comparado com o controle positivo do estudo que correspondeu a 100% de células viáveis, no entanto, quando realizado o estudo de toxicidade *in vivo* para o enxaguatório de jucá o resultado não evidenciou alterações inflamatórias, estando compatível com os resultados *in vitro* encontrados na presente pesquisa.

Martins (2009) avaliou o potencial citotóxico e genotóxico dos extratos da casca e legume da *L. ferrea* em células de mamíferos em cultura. A citotoxicidade avaliada pelo teste de hemólise em eritrócitos de camundongos foi ausente nas concentrações testadas em diluição seriada de razão 2 (10 mg/mL - 0,0156 mg/mL), no teste do Alamar Blue™ a viabilidade celular foi maior que 90% , concluindo que esses extratos são promissores ao desenvolvimento de um biocosmético, uma vez que foi verificada sua atividade antioxidante e ausência de citotoxicidade nas concentrações testadas.

O teste de microdureza do enxaguatório de *L. ferrea* foi analisado através da diferença entre as leituras finais (T1) e leituras iniciais (T0), utilizando-se teste paramétrico para a comparação das médias (ANOVA). Verificou-se que não houve diferença estatisticamente significativa da microdureza superficial do esmalte dos dentes bovinos ( $p = 0,154$ ) entre os grupos (G1 – água destilada, G2 – enxaguatório de *L. ferrea* e G3 – veículo do enxaguatório) (Tabela 9).

Grupo	n	Dureza inicial	Dureza final	% PDS
		Média ± DP	Média ± DP	Média ± DP
Água destilada	10	263,80 ± 18,65 <sup>a</sup>	242,83 ± 12,39 <sup>a</sup>	7,66 ± 5,05 <sup>a</sup>
Enxag. de <i>L. ferrea</i>	10	282,00 ± 18,84 <sup>b</sup>	267,60 ± 14,89 <sup>b</sup>	4,96 ± 4,46 <sup>a</sup>
Veículo	10	291,07 ± 6,29 <sup>b</sup>	264,03 ± 12,71 <sup>b</sup>	9,29 ± 3,88 <sup>a</sup>
p		<b>0,002*</b>	<b>0,001*</b>	0,154*

Tabela 9: Distribuição segundo a média da dureza inicial, final e % PDS (Perda de Dureza Superficial) em relação aos diferentes grupos.

Dp = desvio-padrão;

\*ANOVA. / Letras distintas indicam diferença estatística ao nível de 5% de significância

Donassollo et al (2007) realizaram um estudo com o objetivo de testar a microdureza superficial do esmalte de dentes humanos e de dentes bovinos, concluindo que não houve diferença estatística significativa para os valores médios de dureza entre esmalte de dente bovino e esmalte de dente humano permanente, sugerindo um comportamento similar entre dentes bovinos e dentes humanos, no que se refere à microdureza superficial.

Desta forma, Mota et al (2003) inferiram que os dentes bovinos podem ser considerados substitutos aceitáveis dos dentes humanos, em estudos laboratoriais, pois o uso de dentes bovinos permite o aumento do número amostral e o emprego de dentes em fase similar de maturação.

Como o extrato da planta e, conseqüentemente, o enxaguatório de *L. ferrea* possuem uma coloração escura (marrom-vinho), houve a necessidade de avaliar a capacidade do enxaguatório em causar ou não alteração de cor em esmalte, utilizando-se dentes bovinos e aparelho espectrofotômetro VITAEasyshade (Easyshade<sup>®</sup>, Vivadente, Brea, CA, USA).

Verificou-se que ocorreu pigmentação do esmalte do dente bovino quando em contato com o enxaguatório de *L. ferrea* e com o extrato da planta

(Figuras 43, 44 e 45). A comparação foi múltipla havendo análise ao longo do tempo e entre os grupos.



Figura 43: Grupos I, II, III, IV e V após o teste de alteração de cor.

Onde GI – Clorexidina a 0,12%; GII – Veículo; GIII – Enxaguatório de *L. ferrea*, GIV – Extrato de *L. ferrea*, GV – Água destilada



Figuras 44 e 45: Visão aproximada dos corpos de prova 11 (GIII - enxaguatório) e 16 (GIV - extrato) após 24 horas de imersão nas soluções.

Os corpos de prova apresentaram cores semelhantes no tempo inicial (T1). Com relação à variação de luminosidade ( $\Delta L$ ), após 12 horas e 24 horas de imersão nas soluções, os grupos I, II e V permaneceram com as cores estáveis, porém os grupos III e IV apresentaram alteração de cor (Tabela 10).

Grupos	T1 – Inicial	T2 (12 h)	T3 (24 h)
<b>I – Clorexidina 0,12%</b>	97,1 ( $\pm 3,4$ ) A,a	99,9 ( $\pm 0,3$ ) A,a	97,2 ( $\pm 3,8$ ) A,a
<b>II – Veículo</b>	96,6 ( $\pm 3,4$ ) A,a	92,6 ( $\pm 6,7$ ) A,B,a	97,6 ( $\pm 2,1$ ) A,a
<b>III – Enxaguatório de <i>L. ferrea</i></b>	99,0 ( $\pm 1,3$ ) A,a	84,6 ( $\pm 11,1$ ) B,C,b	79,4 ( $\pm 7,9$ ) B,b
<b>IV – Extrato de <i>L. ferrea</i></b>	97,2 ( $\pm 2,1$ ) A,a	76,4 ( $\pm 7,1$ ) C,b	72,3 ( $\pm 6,7$ ) B,b
<b>V – Água destilada</b>	97,7 ( $\pm 2,4$ ) A,a	97,4 ( $\pm 2,4$ ) A,a	99,6 ( $\pm 0,6$ ) A,a

Tabela 10: Distribuição segundo a média do  $\Delta L$  dos grupos.

Letras distintas indicam diferença estatística ao nível de 5% de significância (teste de *Tukey*).

Minúsculas na horizontal (linha) / Maiúsculas na vertical (coluna)

$\Delta L$  – Variação de luminosidade (do preto ao branco, de 0 ao 100)

Com relação à variação de cor que vai do verde ao vermelho ( $\Delta a$ ), os grupos I, II e V apresentaram cores semelhantes e estáveis ao longo dos tempos T1, T2 e T3, porém os grupos III e IV sofreram alteração de cor nos tempos T2 e T3 se comparados aos demais grupos, apresentando resultados semelhantes entre eles (Tabela 11).

Grupos	T1 – Inicial	T2 (12 h)	T3 (24 h)
<b>I – Clorexidina 0,12%</b>	-2,3 ( $\pm 0,6$ ) A,a	-3,4 ( $\pm 0,5$ ) A,a	-3,3 ( $\pm 0,9$ ) A,B,a
<b>II – Veículo</b>	-1,1 ( $\pm 0,7$ ) A,a	-0,8 ( $\pm 1,2$ ) B,C,a	-1,4 ( $\pm 0,3$ ) B,C,a
<b>III – Enxaguatório de <i>L. ferrea</i></b>	-2,4 ( $\pm 0,3$ ) A,a	1,0 ( $\pm 1,7$ ) C,b	2,8 ( $\pm 3,0$ ) D,b
<b>IV – Extrato de <i>L. ferrea</i></b>	-2,1 ( $\pm 0,4$ ) A,a	5,3 ( $\pm 3,2$ ) D,b	6,7 ( $\pm 2,7$ ) E,b
<b>V – Água destilada</b>	-2,1 ( $\pm 0,7$ ) A,a	-1,7 ( $\pm 0,4$ ) A,B,a	-1,9 ( $\pm 0,4$ ) B,C,a

Tabela 11: Distribuição segundo a média do  $\Delta a$  dos grupos.

Letras distintas indicam diferença estatística ao nível de 5% de significância (teste de *Tukey*).

Minúsculas na horizontal (linha) / Maiúsculas na vertical (coluna)

$\Delta a$  – Variação de cor (do verde ao vermelho, de -120 a + 120)

Com relação à variação de cor que vai do azul ao amarelo ( $\Delta b$ ), os grupos I, II e V apresentaram cores semelhantes e estáveis ao longo dos tempos T1, T2 e T3, porém os grupos III e IV sofreram alteração de cor no tempo T2 se comparados aos demais grupos, apresentando resultados semelhantes entre eles no tempo T3 (Tabela 12).

Grupos	T1 - Inicial	T2 (12 h)	T3 (24 h)
<b>I – Clorexidina 0,12%</b>	16,0 ( $\pm 2,6$ ) A,a	10,2 ( $\pm 3,1$ ) A,a	14,1 ( $\pm 4,8$ ) A,B,a
<b>II – Veículo</b>	19,4 ( $\pm 7,1$ ) A,a	15,68 ( $\pm 10,0$ ) B,C,a	18,5 ( $\pm 4,7$ ) B,a
<b>III – Enxaguatório de <i>L. ferrea</i></b>	14,0 ( $\pm 1,0$ ) A,a	16,6 ( $\pm 4,5$ ) A,B,a	27,5 ( $\pm 4,5$ ) B,C,b
<b>IV – Extrato de <i>L. ferrea</i></b>	18,8 ( $\pm 3,6$ ) A,a	31,2 ( $\pm 9,8$ ) C,a,b	33,9 ( $\pm 4,3$ ) C,b
<b>V – Água destilada</b>	16,8 ( $\pm 4,9$ ) A,a	16,7 ( $\pm 4,4$ ) A,B,a	15,3 ( $\pm 3,9$ ) B,a

Tabela 12: Distribuição segundo a média do  $\Delta b$  dos grupos.

Letras distintas indicam diferença estatística ao nível de 5% de significância (teste de Tukey).

Minúsculas na horizontal (linha) / Maiúsculas na vertical (coluna)

$\Delta b$  – Variação de cor (do azul ao amarelo, de -120 a + 120)

Com relação à variação de cor ( $\Delta E$ ), não houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos I, II e V. O grupo III apresentou o maior valor de  $\Delta E$  (8,23), seguido do grupo III (4,90) (Gráfico 3).

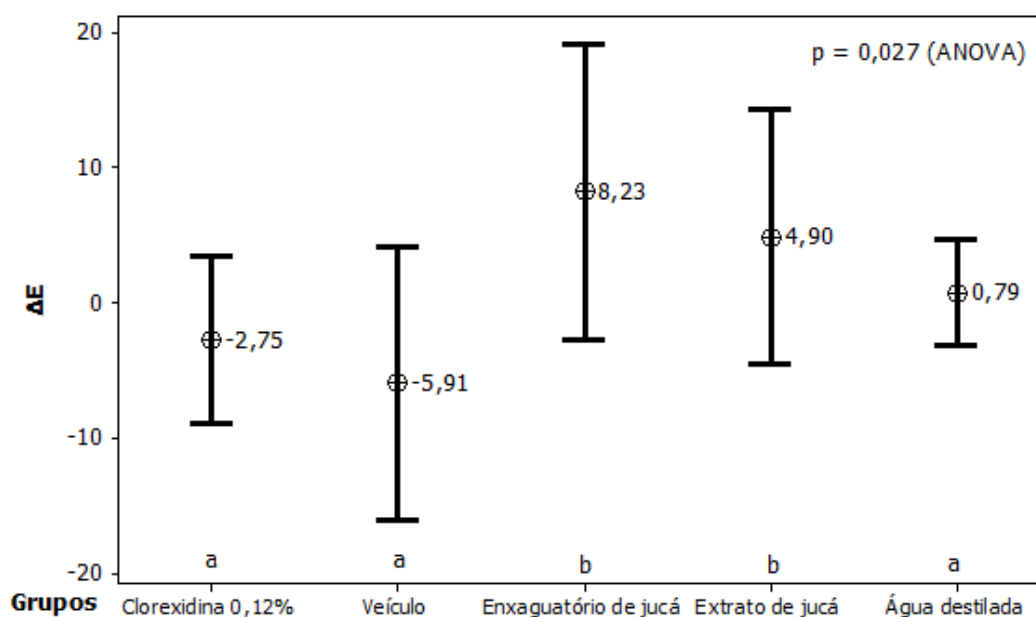


Gráfico 3: Distribuição segundo a média do  $\Delta E$  (Variação de cor) dos diferentes grupos.

Letras distintas indicam diferença estatística ao nível de 5% de significância (teste de Tukey).

O espectrofotômetro foi o método escolhido na presente pesquisa porque a sua análise quantitativa exclui os possíveis erros de subjetividade na avaliação de cor (MOREIRA et al, 2013) e tem sido utilizado em estudos para a alteração de cor dental em materiais restauradores, avaliando-se o  $\Delta E$  com aceitação clínica de cor dental quando inferior a 3,3 (PIRES-DE-SOUZA et al, 2011; SABATINI et al, 2012).

Quando o  $\Delta E$  é menor que 1 a alteração de cor não é detectada pelo olho humano. Se o valor do  $\Delta E$  é entre 1 e 3,3, a alteração de cor é detectada pelo olho humano, mas é clinicamente aceitável (KIM et al, 2006). Na presente pesquisa somente o GV (água destilada) ficou dentro do valor aceitável após 12 horas de imersão ( $\Delta E_1 = 3,2$ ), porém com valor de  $\Delta E_2 = 4,0$ , após 24 horas, mesmo não havendo qualquer alteração visível da cor dos dentes, desse grupo, sugerindo que possíveis falhas metodológicas decorrentes da aplicação da fórmula podem ter ocorrido, uma vez que um estudo sobre confiabilidade metodológica do sistema CIELAB revelou que as coordenadas  $a^*$  e  $b^*$  podem ser correlacionadas, pois estão no mesmo plano volumétrico tridimensional, enquanto a coordenada  $L^*$  sofre variação independente de  $a^*$  e  $b^*$  (KNOSEL et al, 2012).

Tal fato também ocorreu na pesquisa de Ferreira (2013), onde, ao utilizar a mesma metodologia para verificar a possível alteração de cor de dentes permanentes e decíduos submetidos à aplicação intracanal da epigallocatequina-3-galato (EGCG), composto ativo isolado do chá-verde, verificou que não houve alteração de cor significativa clinicamente, embora os valores do  $\Delta E$  tenham ficado acima de 3,3, tendo optado por analisar as coordenadas  $L^*$ ,  $a^*$  e  $b^*$  de maneira independente.



Entretanto, Smullen et al (2012) realizaram uma pesquisa com diversas plantas e concluíram que o extrato de chá verde inibiu completamente a formação do biofilme, mas resultou em uma mancha esverdeada dos dentes que não pôde ser removida por lavagem.

Flotra et al (1971), avaliaram os efeitos do uso de clorexidina, constatando que 12% das superfícies dentárias desenvolveram uma mancha marrom dentro das quatro primeiras semanas de uso, com uma maior frequência nas faces interproximais.

Addy e Moran (1985) avaliaram a alteração de cor extrínseca dos dentes causada pela clorexidina isoladamente ou de forma combinada com outras substâncias. Os voluntários foram submetidos ao estudo, realizando usos regulares de enxaguatórios bucais. O grupo submetido ao enxaguatório bucal com clorexidina, isoladamente, por períodos de 1 min, com intervalos de 30 min, durante 7 h, não demonstrou alteração de cor. No entanto, quando utilizada em associação com outras substâncias químicas auxiliares, Bui, Baumgartner e Mitchell (2008), afirmam que a clorexidina pode desenvolver a capacidade de induzir alteração de cor em esmalte e dentina.

Moreira et al (2013) estudaram a capacidade de manchamento de enxaguatórios com álcool (Listerine<sup>®</sup>), sem álcool (Oral-B<sup>®</sup>) e contendo clorexidina (Periogard<sup>®</sup>), concluindo que somente o Listerine<sup>®</sup> foi capaz de causar alteração de cor clinicamente perceptível após o experimento, não havendo qualquer mudança de cor dos dentes submetidos aos enxaguatórios dos demais grupos.

Uma das limitações dos estudos de alteração de cor *in vitro* é que não importa o quanto eles se aproximam das situações clínicas, pois não é possível

reproduzir condições bucais exatas, mesmo assim esses estudos têm o seu valor como testes de triagem, já que podem sugerir ensaios clínicos futuros valiosos ou servir como estudos observacionais (PRETTY, EDGAR e HIGHAM, 2003; MOREIRA et al, 2013).

Dentro das limitações da presente pesquisa, sugere-se a adição de agentes clareadores ao enxaguatório de *L. ferrea* para a indicação futura de sua aplicação como bochecho, sem causar alteração de cor dos dentes.

## 6. CONCLUSÃO

Com base nos resultados das metodologias empregadas, pode-se concluir que o enxaguatório de *L. ferrea*:

- Apresentou condições de estabilidade (pH, sedimentação, densidade e características organolépticas) e ausência de contaminantes;
- Demonstrou atividade antimicrobiana frente ao *S. mutans*, *S. oralis*, *S. salivarius*, *L. casei* e *C. albicans*, podendo ser utilizado como método terapêutico e/ou preventivo no controle dos micro-organismos presentes no biofilme dental;
- Não foi citotóxico frente aos testes de hemólise e cultura celular com fibroblastos (MRC-5);
- Foi incapaz de causar modificação na microdureza do esmalte dentário bovino, porém causou alteração de cor da estrutura dentária após o uso prolongado;
- Deve ser estudado para melhorar suas características quanto à capacidade de alteração de cor e torná-lo viável para uso na clínica diária, após a realização de testes *in vitro* e *in vivo*.

## REFERÊNCIAS

ADDY M. Chlorhexidine compared with other locally delivered antimicrobials. A short review. J Clin Periodontol 1986. 13(10): 957-64.

ADDY M, MORAN J. Extrinsic tooth discoloration by metals and chlorhexidine: Clinical staining produced by chlorhexidine, iron and tea. Brit Dent J 1985. 159(1): 331-4.

AGARWALA M, YADAV RNS. Phytochemical analysis of some medicinal plants. J Phytology 2011. 3(12): 10-4.

AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. Dispõe sobre o registro de medicamentos fitoterápicos. RDC nº 017, de 24 de fevereiro de 2000.

\_\_\_\_\_. Dispõe sobre o registro de medicamentos genéricos. RDC nº 010, de 02 de janeiro de 2001.

\_\_\_\_\_. Determina a publicação do “Guia para a realização de estudos de estabilidade de medicamentos”, anexo a esta Resolução. RE nº 560, de 02 de abril de 2002.

\_\_\_\_\_. Guia de controle de qualidade de produtos cosméticos. 2a edição, Revista – Brasília: Anvisa, 2008.

AHMAD I, BEG AZ. Antimicrobial and phytochemical studies on 45 Indian medicinal plants against multi-drug resistant human pathogens. J Ethnopharm 2001. 74(2): 113–23.

ALBANDAR JM, GJERMO P, PREUS HR. Chlorhexidine use after two decades of over-the-counter availability. J Periodontol 1994. 65(2): 109-12.

ALMEIDA BS. Uso de clorexidina associada com a escovação no controle de placa dentária de escolares. RGO 2001. 49(3): 133-8.

ALMEIDA RF et al. Associação entre doença periodontal e patologias sistêmicas. Rev Port Clin Geral 2006. 22: 379-90.

AL-TANNIR MA, GOODMAN HS. A review of chlorhexidine and its use in special populations. Spec Care Dentist 1994. 14(3): 116-22.

ALVES M et al. Diagnóstico clínico e protocolo de tratamento do desgaste dental não fisiológico na sociedade contemporânea. Odontologia Clínico-Científica 2012. 11(3): 247-51.

ALVES EG et al. Estudo comparativo de técnicas de *screening* para avaliação da atividade antibacteriana de extratos brutos de espécies vegetais e de substâncias puras. Quim Nova 2008. 31(5): 1224-9.

AMAECHI BT, HIGHAM SM. Dental erosion: Possible approaches to prevention and control. J Dent 2005. 33(3): 243-52.

ANDRADE IP et al. Concentração inibitória mínima de antissépticos bucais em micro-organismos da cavidade oral. Rev Bra Pesq Saúde 2011. 13(3): 10-6.

ANDREOLLI RS, LARA EHG. Avaliação “*in vitro*” da eficácia de enxaguatórios bucais remineralizantes Ifarma. 2004. 16 (7-8): 58-63.

ANIBAL PC. Potencial de ação antimicrobiana *in vitro* de extratos de plantas na inibição de *Candida* spp, *Streptococcus mutans* e *Staphylococcus aureus*. Dissertação de Mestrado. Piracicaba: Faculdade de odontologia de Piracicaba, 2007. 71p.

ARANGO HG. Bioestatística Teórica e Computacional. Guanabara Koogan, 2001.

ARAÚJO DB, LIMA MJP, ARAÚJO RPC. Ação dos agentes clareadores contendo peróxido de hidrogênio e peróxido de carbamida sobre o esmalte dental humano. R Ci Méd Biol 2007. 6(1): 100-21.

BALBACH A. As Plantas que Curam. 2 ed. São Paulo: Editora Missionária, 1992.

BANDEIRA MFCL, OLIVEIRA MRB, BENATTI NETO C, LIA RCC. Estudo comparativo da compatibilidade biológica em molares de rato do óleo essencial e da resina da *Copaifera multijuga* (óleo de copaíba), associados ao hidróxido de cálcio. J Bras Clin Estet Odont 1999. 3(16): 46-52.

BARAKAT L. Avaliação da viabilidade de obtenção de formas farmacêuticas plásticas contendo extrato seco de *Caesalpinia ferrea* Mart. 2011. 100f. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas), Universidade Federal do Amazonas, Manaus.

BARBOUR ME, REES JS. The laboratory assess of enamel erosion: a review. J Dent 2004. 32: 591-602.

BARTLETT DW. O papel da erosão no desgaste dentário: etiologia, prevenção e controle. Int Dental J 2005. 55: 277-84.

BEELEN PMG, PEREIRA FILHO JM, BEELEN RN. Avaliação de taninos condensados em plantas forrageiras. Zootec, Paraíba. 2008.

BENSO B e OTUKI MF. Atividade anti-inflamatória da *Malva Sylvestris* e perspectivas do uso em Periodontia. PerioNews 2012. 6(2): 154-8.

BORGES AH et al. Antimicrobial effectiveness of different trademarks mouthwashes with and without alcohol against different organisms: *in vitro* study. Rev Odonto Ciênc 2010. 25(2): 178-81.

BORGHI WMMC, MOIMAZ SAS e SALIBA NA. Métodos alternativos para higienização bucal e terapêutica odontológica. Rev Inst Ciênc Saúde 2005. 23(4): 309-14.

BRASIL. Ministério da Saúde. Projeto SB Brasil - Condição de Saúde Bucal da População Brasileira: 2002-2003. Brasília: Editora MS; 2003. 68 p.

\_\_\_\_\_. Ministério da Saúde. Política Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos. Secretaria de Ciência, Tecnologia e Insumos Estratégicos, Departamento de Assistência Farmacêutica. – Brasília: Ministério da Saúde, 2006. 60 p. – (Série B. Textos Básicos de Saúde).

\_\_\_\_\_. Ministério da Saúde. Secretaria de Atenção à Saúde. Departamento de Atenção Básica. Saúde Bucal / Ministério da Saúde, Secretaria de Atenção à Saúde, Departamento de Atenção Básica. – Brasília: Ministério da Saúde, 2008. 92p. – (Série A. Normas e Manuais Técnicos) (Cadernos de Atenção Básica; 17). Disponível em: [http://bvsms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/saude\\_bucal.pdf](http://bvsms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/saude_bucal.pdf). Acesso em 05/01/2014.

\_\_\_\_\_. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). Resolução RDC 14 de 31 de março de 2010. Diário Oficial da União de 31 de março

de 2010. Dispõe sobre o registro dos medicamentos fitoterápicos Brasília. Disponível em: <http://www.anvisa.gov.br/e-legis/>. Acesso em: 03/02/2014.

\_\_\_\_\_. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). Resolução RDC 211 de 14 de julho de 2005. Dispõe sobre Normas e Regulamentos para Registro de Produtos Cosméticos. Disponível em: [http://www.agora.mfa.gr/agora/images/docs/radE8A2DRDC\\_211\\_2005.pdf](http://www.agora.mfa.gr/agora/images/docs/radE8A2DRDC_211_2005.pdf). Acesso em: 03/02/2014.

\_\_\_\_\_. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). Resolução RDC 13 de 15/03/2013. Dispõe sobre Normas que estabelecem as Boas Práticas de Fabricação (BPF) para os produtos fitoterápicos tradicionais. Disponível em: <http://www.licencasanitaria.com/2013/03/rdc-132013-norma-para-fabricacao-de.html>. Acesso em: 02/03/2014.

\_\_\_\_\_. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Formulário de Fitoterápicos da Farmacopéia Brasileira / Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Brasília: Anvisa, 2011. 126p.

BUGNO A et al. Avaliação da contaminação microbiana em drogas vegetais. Rev Bras Ciênc Farmac 2005. 41(4): 491-7.

BUI TB, BAUMGARTNER JC, MITCHELL JC. Evaluation of the interaction between sodium hypochlorite and chlorhexidine gluconate and its effect on root dentin. J Endod. 2008. 34(2): 181-5.

BURNET GW, SCHERP HW, SCHUSTER GS. Microbiologia oral & doenças infecciosas. 4. ed., Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1978.

BURRATO EM, ANDRADE L, RATH IBS, TAMES DR. Avaliação do potencial erosivo aos tecidos duros dentais de bebidas esportivas nacionais. Rev ABO Nac 2002. 10(2): 109-12.

BUSSADORI CM. Avaliação de enxaguatórios bucais na atividade biológica do biofilme formado em braquetes ortodônticos. Dissertação (Mestrado) – Programa de Pós-graduação Interunidades Bioengenharia/Escola de Engenharia de São Carlos/Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto/ Instituto de Química de São Carlos da Universidade de São Paulo, para título de mestre em Ciências. São Paulo, p.94, 2013.

CARVALHO JCT. *Caesalpinia ferrea* (Pau-ferro): Avaliação da atividade anti-inflamatória e analgésica. 125 p. 1993. (Dissertação Mestrado) – FCF/USP, Ribeirão Preto-SP.

CARVALHO JCT et al. Preliminary studies of analgesic and anti-inflammatory properties of *Caesalpinia ferrea* crude extract. J Ethnopharm 1996. 53: 175-8.

CAVALHEIRO MG et al. Atividades biológicas e enzimáticas do extrato aquoso de sementes de *Caesalpinia ferrea* Mart., Leguminosae. Rev Bras Farmacogn 2009. 19 (2B): 586-91.

CONDE NCO. Avaliação da atividade antimicrobiana de plantas da Amazônia sobre bactérias do biofilme dental. 2006. Tese (Doutorado em Estomatologia) - Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa.

CONSELHO FEDERAL DE ODONTOLOGIA. Reconhece e regulamenta o uso pelo cirurgião-dentista de práticas integrativas e complementares à saúde bucal. Regulamenta o uso da Acupuntura, Fitoterapia, Terapia Floral, Hipnose, Homeopatia e

Laserterapia como “práticas integrativas e complementares” aos procedimentos odontológicos. Resolução CFO 82/2008. Diário oficial da União de 1 de outubro de 2008. Brasília. Disponível em: <http://cfo.org.br/>.

CORDEIRO CHG et al. Avaliação farmacognóstica e atividade antibacteriana de extratos vegetais empregados em gel dentifrício. Rev. Bras PI Med 2006. 8(4): 173-82.

COWAN MM. Plant products as antimicrobial agents. Clin Microb Reviews 1999.12(4): 564–82.

CUMMING BR, LÖE H. Optimal dosage and method of delivering chlorhexidine solutions for the inhibition of dental plaque. J Periodontal Res 1973. 8(2):57-62.

DOKU HC, SHKLAR G, BUGBEE B. The effect of epsilon aminocaproic acid on the healing of extraction wounds in hamsters. Oral Surg 1966. 22: 569-77.

DONASSOLO TA et al. Avaliação da microdureza superficial do esmalte e da dentina de dentes bovinos e humanos (permanentes e decíduos), Rev Odonto Ciênc 2007. 22(58): 311-6.

EVANGELISTA SS, SAMPAIO FC, PARENTE RC, BANDEIRA MFCL. Fitoterápicos na Odontologia: Estudo etnobotânico na cidade de Manaus. Rev Bras PI Med 2013. 15(4): 513-9.

EVANS GO. Animal Hematotoxicology: a partial guide for toxicologists and biomedical researchers. [S.I.]: CRC, 2009.

FARIA JÚNIOR EB. Avaliação da atividade biológica do extrato das folhas de *Casearia sylvestris* e suas frações sobre *Streptococcus mutans* (Monografia). Lavras: Universidade do Estado de Minas Gerais, Centro Universitário de Lavras, 2005.

FARMACOPÉIA BRASILEIRA. 5. ed. Vol I: Brasília. 2010.

FEJERSKOV O, KIDD E. Cárie Dentária – A doença e seu tratamento clínico. 1.ed. São Paulo: Santos, 2005.

FERREIRA AO, SOUZA GF. Preparações orais líquidas. 2ed. São Paulo: Pharmabooks, 2007.

FERREIRA DCA. Desenvolvimento e caracterização físico-química de um sistema para liberação intracanal de Epigalocatequina-3-galato e seu efeito na cor dos dentes. (Dissertação). Ribeirão Preto-SP: Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, 2013. 99p.

FLÖTRA L, GJERMO P, RÖLLA G, WAERHAUG J. Side effects of chlorhexidine mouthwashes. Scand J Dent Res 1971. 79(2): 119-25.

FREIRES IA et al. Atividades antibacteriana e antiaderente *in vitro* de tinturas de *Schinus terebinthifolius* (Aroeira) e *Solidago microglossa* (Arnica) frente a bactérias formadoras do biofilme dentário. Odontol Clín-Cient (Online) 2010. 9(2): 139-43. Disponível em <[http://revodonto.bvsalud.org/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S1677-38882010000200010&lng=pt&nrm=iso](http://revodonto.bvsalud.org/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1677-38882010000200010&lng=pt&nrm=iso)>. Acesso em 12 jan. 2014.

GALDINO G, MESQUITA MR, FERRAZ IDK. Descrição morfológica da plântula e diásporos de *Caesalpinia ferrea* Mart. Rev Bras de Biociênc 2007. 5(supl. 2): 747-9.

GEBRAN MP, GEBERT AN. Controle químico e mecânico de placa bacteriana. Tuiuti: Ciência e Cultura 2002. 26(3): 45-58.

- GODOI APT. Estudo do óleo essencial de *Casaeria sylvestris* e da formulação de enxaguatório bucal. Caracterização química, citotoxicidade, potencial antimicrobiano e efeito nas propriedades dos materiais odontológicos estéticos. Tese de Doutorado. Faculdade de Odontologia da Universidade de Ribeirão Preto/USP. 210p. 2013.
- GONZALES FG, BARROS SBM, BACCHI EM. Atividade antioxidante e perfil fitoquímico de *Caesalpinia ferrea* Mart. Braz J Pharmac Sci 2004. 40(suppl 1): 79-83.
- GRIPPO JO, SIMRING M. SCHREINER S. Attrition, Abrasion, Corrosion and Abfraction Revisited: A new perspective on tooth surface lesions. J Am Dent Assoc 2004. 135: 1109-18.
- GUEDES VMS, SILVA ACB, PEREIRA JC. Clareamento dental – Efeitos dos agentes clareadores externos no esmalte e na dentina. Odontologia, Ciência e Saúde – Rev CROMG 2009. 10(2): 64-70.
- GUNSOLLEY JC. Clinical efficacy of antimicrobial mouthrinses. J Dent 2010. 38(1): 6-10.
- GÜRGAN S, ÖNEN A, KÖPRÜLÜ H. *In vitro* effects of alcohol- containing and alcohol-free mouthrinses on microhardness of some restorative materials. J.Oral Rehabil 1997. 24(3): 244-6.
- HARA A, LUSSI A, ZERO D. Biological Factors. In: Lussi, A. (Ed.). Dental Erosion: From diagnosis to therapy. Bern GM. Whitford: 88-96, 2006.
- HASLAM E. Chemistry of vegetables tannins. London: Academic Press: p. 179, 1996.
- ISAAC VLB et al. Protocolo para ensaios físico-químicos de estabilidade de fitocosméticos. Rev Ciên Farm Básica Apl 2008. 29(1): 81-96.
- JORGE AOC et al. Presença de leveduras do gênero *Candida* na saliva de pacientes com diferentes fatores predisponentes e de indivíduos controle. Rev Fac Odontol Univ São Paulo 1997. 11(4): 279-85.
- KALDAHL WB et al. Long-term evaluation of periodontal therapy: Response to 4 therapeutic modalities. J Periodontol 1996. 67(2): 93-102.
- KATO MT, LEITE AL, HANNAS AR, BUZALAF MAR. Gels containing MMP inhibitors prevent dental erosion *in situ*. J. Dent Res 2010. 89(5): 468-472.
- KELLEHER M, BOMFIM D, AUSTIN R. Biologically based restorative management of tooth wear. International J Dentistry 2012. 1-9.
- KHANBABAEE K, REE TV. Tannins: Classification and Definition. Natural Product Reports 2001. 18: 641-49.
- KIM JH, LEE YK, POWERS JM. Influence of a series of organic and chemical substances on the translucency of resin composites. J Biomed Mater Res B Appl Biomater 2006. 77(1): 21-7.
- KNÖSEL M et al. A novel method for testing the veridicality of dental color assessment. Eur J Orthod 2012. 34(1): 19-24.
- LAGO ADN. Adesão à superfície de esmalte clareado: Avaliação *in vitro* por microtração. 2009.144f. Dissertação (Mestrado em Odontologia, Dentística)-Faculdade de odontologia, Universidade de São Paulo, São Paulo.



LASCALA NT. Promoção de saúde bucal. 1. ed. São Paulo: Editora Artes Médicas Ltda, 1997.

LINÑAN-DURAN C, MENESES-LOPÉZ A, DELGADO-COTRINA L. Evaluación *in vitro* del efecto erosivo de tres bebidas carbonatadas sobre la superficie Del esmalte dental. Rev Estomatol Herediana 2007. 17(2): 58-62.

LORENZI H. Plantas medicinais no Brasil: Nativas e exóticas. Nova Odessa: Plantarum, 2008. 544p.

MAEKAWA LE et al. Atividade antimicrobiana de enxaguatórios bucais sem álcool à base de clorexidina sobre *Candida albicans*. Rev Odontol UNESP 2010. 39(1): 15-9.

MAGALHÃES AC et al. Effect of 4% titanium tetrafluoride solution on dental erosion by a soft drink: An *in situ/ex vivo* study. J Dent 2008. 53(5): 399-404.

MAIA CN. Análise fitoquímica e atividade antibacteriana "*in vitro*" de extrato de plantas do Cerrado, Dissertação (Mestrado em Ciências biológicas). Universidade Estadual de Montes Claros, Montes Claros/MG. 2008.

MAIA GN. Caatinga: árvores e arbustos e suas utilidades. São Paulo: D&Z Computação Gráfica Editora, 2004. 413p.

MARINHO BVS e ARAÚJO ACS. O uso de enxaguatórios bucais sobre a gengivite e o biofilme dental. Int J Dent 2007. 6(4): 124-131.

MARINHO JVF et al. Technological characteristics of fruits of *Caesalpinia ferrea* Mart. (Leguminosae) as medicinal raw material. Resumos in: XX Simpósio de plantas medicinais, 2008, São Paulo.

MARREIRO RO, BANDEIRA MFCL, CONDE NCO, SOUSA TP. Obtenção de um extrato etanólico de *Caesalpinia ferrea* L. e avaliação da estabilidade microbiológica e atividade antimicrobiana para formulação de um enxaguatório bucal. Relatório final de PIBIC/FAPEAM/UFAM. 2008. 56p.

MARREIRO RO. *Caesalpinia ferrea* L: Avaliação da atividade antimicrobiana, controle de qualidade e citotoxicidade de uma formulação comercial de enxaguatório bucal. Dissertação apresentada ao Programa de pós-graduação em Saúde, Sociedade e Endemias na Amazônia/FIOCRUZ, 2011.

MARREIRO RO et al. Evaluation of the stability and antimicrobial activity of an ethanolic extract of *Libidibia ferrea*. Clinical, Cosmetic and Investigational Dentistry 2014. 6: 1-5.

MARSH PD, MOTER A, DEVINE DA. Dental plaque biofilms: communities, conflict and control. Periodontology 2000. 2011 (55): 16–35.

MARSH PD. Controlling the oral biofilm with antimicrobials. J Dent 2010. 38(1): 11-5.

MARTINS KTP. Avaliação do potencial citotóxico e genotóxico da *Caesalpineia ferra in vitro*. XIX Congresso de Iniciação Científica da UFAM. Orientadora: Marne Carvalho de Vasconcellos. PIB-S/0057/2009.

MATUMOTO MSS. Avaliação *in vitro* das alterações superficiais do esmalte dentário de dentes permanentes submetidos à ação de bebidas energéticas. [Tese]. São Paulo: Universidade de São Paulo, 2008.

MAURYA DK, NANDAKUMAR N, DEVASAGAYAM TPA. Anticancer property of gallic acid in A549, a human lung adenocarcinoma cell line, and possible mechanisms. *J Clin Biochemistry and Nutrition* 2011. 48(1): 85-90.

MAZID M et al. Role of secondary metabolites in defense mechanisms of plants. *Biology and Medicine* 2011. 3: 232-49.

MELLO CP, SANTOS SC. Taninos. In: *Farmacognosia: Da planta ao medicamento*. Organizado por Cláudia Maria Oliveira Simões et al. 4 ed. Porto Alegre / Florianópolis: Editora Universitária / UFRGS / Ed. da UFSC, 2002. 950 p.

MORAN J, ADDY M, ROBERTS S. A comparison of natural product, triclosan and chlorhexidine mouthrinses on 4-day plaque regrowth. *J Clin Periodontol* 1992. 19(1): 578-82.

MOREIRA ACA, SANTOS TAM, CARNEIRO MC, PORTO MR. Atividade de um enxaguatório bucal com clorexidina a 0,12 por cento sobre a microbiota sacarolítica da saliva. *Rev Ciênc Méd Biol* 2008. 7(3): 260-72.

MOREIRA MJS, FERREIRA MBC, HASHAZUMI LN. Avaliação *in vitro* da atividade antimicrobiana dos componentes de um enxaguatório bucal contendo malva. *Pesq Bras Odontoped Clin Integr* 2012. 12(4): 505-09.

MOREIRA MSC et al. Avaliação microestrutural do esmalte bovino exposto a bebidas lácteas fermentadas e propriedades físico químicas. *Rev Pesq Bras Odontoped Clín Integrada* 2012.12(2): 161-67.

MOREIRA AD et al. Chromatic analysis of teeth exposed to different mouthrinses. *J Dent* 2013. 41(suppl 5): 24-7.

MOTA CS et al. Tensile bond strength of four resin luting agents bonded to bovine enamel and dentin. *J Prosthet Dent* 2003. 89(6): 558-64.

NASCIMENTO VT et al. Controle de qualidade de produtos à base de plantas medicinais comercializados na cidade do Recife-PE: Erva-doce (*Pimpinella anisum* L.), Quebra-pedra (*Phyllanthus* spp.), Espinheira santa (*Maytenus ilicifolia* Mart.) e Camomila (*Matricaria recutita* L.). *Rev Bras PI Med* 2005. 7(3): 56-64.

NÓBREGA AM et al. Avaliação da irritabilidade ocular induzida por ingredientes de cosméticos através do teste de Draize e dos Métodos HET-CAM e RBC. *Universitas: Ciências da Saúde* 2008. 6: 103-20.

NUNES MCP et al. Contribuição do estudo do biofilme dentário para o tratamento das doenças periodontais. *Rev Inst Ciênc Saúde* 2007. 25(1): 55-61.

NUNES LNSA et al. Estudo "in situ" da superfícies de dentes bovinos após exposição por medicamento fitoterápico. *Rev Pesq Bras Odontoped Clín Integr* 2012. 12(1): 07-12.

PALOMBO EA. Traditional medicinal plant extracts and natural products with activity against oral bacteria: Potential application in the prevention and treatment of oral diseases. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine* 2011. 7: 1-15.

PAPOUTSI Z et al. Evaluation of Estrogenic/Antiestrogenic Activity of Ellagic Acid via the Estrogen Receptor Subtypes ER $\alpha$  and ER $\beta$ . *J Agric and Food Chem* 2005. 53: 7715-20.

PARNHAM MJ, WETZIG H. Toxicity screening of liposomes. *Chem Phys Lipids* 1993. 64: 263–74.

PELLISSARI GP. Estudo farmacognóstico e avaliação das atividades antibacteriana e imunomoduladora de *Melanpodium divaricatum* (Rich. In Pers.) DC (Asteraceae). 2008. 178 p. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) – Universidade Estadual Paulista. “Júlio de Mesquita Filho”. Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Araraquara, São Paulo.

PEREIRA CA et al. Ação antimicrobiana in vitro de extratos glicólicos de *Psidium guajava* L., *Syzygium cumini* L. e *Pimpinella anisum* L. *Rev Inst Adolfo Lutz* 2009. 68(1): 102-8.

PEREIRA LP et al. Polysaccharide fractions of *Caesalpinia ferrea* pods: Potential anti-inflammatory usage. *J Ethnopharm* 2012. 139: 642-48.

PETERS VM et al. Evaluation of reproductive toxicity of aqueous extract of the fruits from *Caesalpinia ferrea* Mart. in rats. *Boletín Latinoamericano y del Caribe de Plantas Medicinales y Aromáticas* 2008. 7(5): 268-72.

PIERI FA et al. Bacteriostatic effect of copaiba oil (*Copaiba officinalis*) against *Streptococcus mutans*. *Braz Dent J* 2012. 23(1): 36-8.

PIRES-DE-SOUZA FCP et al. Color stability of silorane-based composites submitted to accelerated artificial ageing – An in situ study. *J Dent* 2011. 39(Suppl 1): 18-24.

PITHON MM et al. Avaliação *in vitro* da citotoxicidade de enxaguatórios bucais com e sem álcool. *Rev Cir Traumatol Buco-Maxilo-Fac* 2011. 11(1): 9-12.

PRETTY IA, EDGAR WM, HIGHAM SM. The erosive potential of commercially available mouthrinses on enamel as measured by quantitative light-induced. *J Dent* 2003. 31:313–9.

RAJABALIAN S et al. Cytotoxicity evaluation of Persica mouthwash on cultured human and mouse cell lines in the presence and absence of fetal calf serum. *Indian J Dent Res* 2009. 20(2): 169-73.

RAMOS INC et al. Candidose Bucal em pacientes HIV-positivos. *JBC J Bras Clin Estet Odontol* 1999. 3(13): 59-61.

RIOS D et al. Effect of salivary stimulation on erosion of human and bovine enamel subjected or not to subsequent abrasion: an in situ/ex vivo study. *Caries Res.* 2006; 40 (3): 218-23.

RIOS MNS, PATORE JÚNIOR F et al. Plantas da Amazônia: 450 espécies de uso geral. Brasília: Universidade de Brasília, Biblioteca Central, 2011. 3140p. Livro digital, disponível em: <http://leunb.bce.unb.br/>, acesso em: 04/01/2014.

ROSA PCA, MAIA LA, GALLO SM. Prevenção e tratamento da saúde bucal com planta medicinal da Amazônia. XIX Jornada de Iniciação científica PIBIC INPA – CNPq/FAPEAM. 2010.

ROWE RC, SHESKEY PJ, WELLER PJ. Handbook of pharmaceutical excipients. Great Britain: Pharmaceutical Press. 4ed. 2003. 776p.

SABATINI C, CAMPILLO M, AREF J. Color stability of ten resin-based restorative materials. *J Esthet Restor Dent* 2012. 25: 185-99.

SAMPAIO FC et al. *In vitro* antimicrobial activity of *Caesalpinia ferrea* Martius fruits against oral pathogens. J Ethnopharm 2009.124: 289–94.

SANTOS RI et al. Óleo essencial de *Thymus vulgaris*: Elaboração de enxaguatório bucal e avaliação do efeito *in vitro* na formação da placa bacteriana. Lat Am J Pharm 2010. 29(6): 941-7.

SANTOS LW. Propagação e produção de mudas de Mulungu, *Erythrina velutina* (Fabaceae) e Jucá, *Caesalpinia ferrea* MART. ex TUL. (Caesalpiniaceae) em Mossoró-RN. Tese (Doutorado em Fitotécnica. Área de concentração em Plantas Medicinais) – Universidade Federal Rural do Semiárido. Mossoró, 2011.

SANTOS FG, AGUIAR YPC, CAVALCANTI AL. Caracterização metodológica dos estudos *in situ* sobre erosão dentária: Uma abordagem atual. R Bras Cienc Saúde 2013. 17(1): 105-12.

SCARAMUCCI T et al. *In vitro* evaluation of the erosive potential of Orange juice modified by food additives in enamel and dentine. J Dent 2001. 39: 841-48.

SHELLIS RP et al. Methodology and models in erosion research: Discussion and conclusions. Caries Res 2011. 45 (suppl 1): 69–77.

SILVA ACB, CRUZ JS, SAMPAIO FC, ARAÚJO AM. Detection of oral Streptococci in dental biofilm from caries-active and caries-free children. Braz J Microb 2008. 39(4): 648-51.

SIMÕES CMO et al. Farmacognosia: da planta ao medicamento. 5ª ed. Porto Alegre/Florianópolis: Editora da UFRGS/Editora da UFSC; 2004.

SIMÕES CACG, BANDEIRA MFCL. Formulação de um gel de óleo de copaíba (Copaíba multijuga) e avaliação da atividade antibacteriana sobre cepas de Streptococcus isolados da placa dental. 2004. Dissertação (Mestrado em Patologia Tropical) – Universidade do Estado do Amazonas, Manaus.

SIMÕES RCS et al. Avaliação *in vitro* da atividade antimicrobiana de enxaguatórios bucais. Rev Bras Odontol 2011. 68(1): 91-4.

SOARES DGS et al. Susceptibilidade *in vitro* de bactérias bucais a tinturas fitoterápicas. Rev Odonto Ciênc 2006. 21(53): 232-7.

SOUZA FS, MACIEL CCS. Produtos fitoterápicos e a necessidade de um controle de qualidade microbiológico. VEREDAS FAVIP - Rev Eletrônica de Ciênc 2010. 3(2): 22-30.

SULIEMAN MAM. An overview of tooth-bleaching techniques: chemistry, safety and efficacy. Periodontology 2000. 2008. 48: 178-69.

TAKEMURA OS. Tendência nos estudos de plantas medicinais. Arq Ciênc Saúde Unipar 2008. 12(3): 165-274.

TEIXEIRA MFS et al. Fungos da Amazônia: Uma riqueza inexplorada (Aplicações Biotecnológicas). Manaus. EDUA, 2011. 255p.

THYLSTRUP A, FEJERSKOV O. Cariologia clínica. 2ª.ed., São Paulo: Ed. Santos, 1995. 421p.

\_\_\_\_\_. Tratado de Cariologia. 2ª ed. Rio de Janeiro: Cultura Médica; 1998.

\_\_\_\_\_. Cariologia Clínica. 2ª. ed. São Paulo: Santos, 2001.

TORRES CRG, KUBO CH, ANIDO AA, RODRIGUES JR. Agentes antimicrobianos e seu potencial de uso na Odontologia. Rev Fac Odontol São José dos Campos 2000. 3(2): 40-6.

TRENTIN DS et al. Tannins possessing bacteriostatic effect impair *Pseudomonas aeruginosa* adhesion and biofilm formation. PLoS One 2013. 8(6): e66257.

TURSSI CP et al. Viability of Using Enamel and Dentin from Bovine Origin as a Substitute for Human Counterparts in na Intraoral Erosion Model. Braz Dent J 2010. 21(4): 332-6.

UEDA H et al. Aldose reductase inhibitors from the fruits of *Caesalpinia ferrea* Mart. Phytomedicine 2001. 8(5): 377–81.

VIANA FC, SANTANA ACM, MOURA RMX. Identificação fitoquímica de flavonoides e taninos em folhas de pitanga (*Eugenia uniflora* L.) utilizadas tradicionalmente na região Sul da Bahia. InterPHacis 2012. 1: 28-37.

VIEIRA S. Bioestatística, Tópicos Avançados. 2ª ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2004.

VINAGRE NPL et al. Efetividade clínica de um enxaguatório bucal fitoterápico com tintura padronizada de *Calendula officinalis* na manutenção da saúde periodontal. Ver Odontol UNESP 2011. 40 (1): 30-5.

XAVIER AFC et al. Avaliação *in vitro* da microdureza do esmalte dentário após exposição a bebidas isotônicas. Pes Bras Odontoped Clín Integrada. 2010.10(2): 145-50.

YAMAMOTO HC et al. Controle de qualidade microbiológico de produtos farmacêuticos, cosméticos e fitoterápicos produzidos na Zona da Mata, MG. Anais do 2º Congresso Brasileiro de Extensão Universitária, 2004; Belo Horizonte, MG. Disponível em <http://www.ufmg.br/congrent/Desen/Desen7.pdf>, acesso em: 20 de janeiro de 2014.

ZANATTA FB, RÖSING CK. Clorexidina: mecanismo de ação e evidências atuais de sua eficácia no contexto do biofilme supragengival. Scientific-A 2007. 1(2): 35-43.

ZANIN SMW et al. Enxaguatório bucal: principais ativos e desenvolvimento de fórmula contendo extrato hidroalcoólico de *Salvia officinalis* L. Visão Acadêmica 2007. 8(1): 19-24.

ZERO DT. Etiology of dental erosion – extrinsic factors. Eur J Oral Sci 1996. 104(2): 162-77.