



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS
PROGRAMA DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA - PIBIC
FACULDADE DE ODONTOLOGIA**

**CONTROLE DE QUALIDADE DE UMA FORMULAÇÃO DE
ENXAGUATÓRIO BUCAL À BASE DE *LIBIDIBIA FERREA* L**

PIB-S/0052/2014

LARISSA ALVES DE LIMA E SOUZA

**MANAUS - AM
2015**



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS
FACULDADE DE ODONTOLOGIA
PIBIC**

LARISSA ALVES DE LIMA E SOUZA

**CONTROLE DE QUALIDADE DE UMA
FORMULAÇÃO DE ENXAGUATÓRIO BUCAL À BASE
DE *LIBIDIBIA FERREA L***

Projeto de pesquisa apresentado ao
Programa de iniciação científica (PI-
BIC) da Universidade Federal do
Amazonas.

ORIENTADORA: PROF^A. DR^A. NIKEILA CHACON DE OLIVEIRA CONDE

**MANAUS – AM
2015**

RESUMO

A utilização de plantas com uma finalidade terapêutica remete a uma prática antiga realizada por nossos ancestrais. A difusão da Fitoterapia se faz presente nas mais diversas áreas da saúde, assim como na prática odontológica. com o intuito de prevenir e tratar doenças bucais, tais como cárie e doença periodontal. Dentre as plantas utilizadas na Odontologia, está a *Libidibia ferrea*, conhecida como jucá ou pau-de-ferro, a qual possui comprovadas propriedades terapêuticas anti-inflamatória, antitérmica, analgésica, antimicrobiana e antifúngica. O Objetivo deste estudo foi avaliar *in vitro* estabilidade farmacológica de um enxaguatório bucal fitoterápico à base do extrato de *Libidibia ferrea* (228.022- INPA) nos períodos de 0, 30, 60, 90, 120 e 180 dias, em três condições de armazenamento: temperatura ambiente ($30 \pm 2^\circ \text{C}$), ar condicionado ($18 \pm 2^\circ \text{C}$) e geladeira ($5 \pm 2^\circ \text{C}$). Após preparação da formulação, a solução foi filtrada utilizando um sistema de filtração à vácuo ($0,22 \mu\text{m}$) para garantir esterilidade da mesma. Foram avaliadas características de estabilidade, pH, sedimentação, densidade e a presença de contaminantes, que consistiu no controle microbiológico do extrato e do enxaguatório de jucá através da determinação do número total de microrganismos e pesquisa de *Salmonella sp.*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Staphylococcus aureus*. Para avaliação do pH e densidade, os dados foram analisados pelos testes ANOVA e Tukey, enquanto que os demais resultados foram tabulados e descritos pela estatística descritiva. Na avaliação dos caracteres organolépticos, as amostras da geladeira de 60 e 90 dias apresentam-se brilhosas, enquanto que as amostras do ar condicionado apresentaram, nos tempos 120 e 180 um odor amadeirado azedo e uma coloração marrom opaca. Já nas amostras de temperatura ambiente, apenas na amostra de 180 dias pode-se sentir um odor amadeirado azedo e coloração marrom opaca. Na sedimentação, o teste foi positivo na amostra analisada de 90, 120 e 180 dias da temperatura ambiente, na amostra do ar condicionado de 120 e 180 dias e na amostra de 180 dias da geladeira; no teste de pH, quando comparados os intervalos de tempo 30-90 dias ($<0,001$) e 60-90 dias ($<0,001$) os resultados apresentaram diferença estatisticamente significantes, enquanto que os resultados da densidade não apresentaram diferenças estatisticamente significantes. O teste de avaliação de contaminantes foi positivo para *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli* no tempo 30 e 90 respectivamente, ambos no ambiente geladeira enquanto que, para todos os outros microrganismos pesquisados foi negativo. Portanto, conclui-se que o enxaguatório apresentou melhores condições de estabilidade e qualidade sem contaminação significativa nos ambientes: ar condicionado e temperatura ambiente.

1. INTRODUÇÃO

Biofilmes são formados por comunidades heterogêneas de microrganismos, sendo a atividade articulada por fatores como dieta, saliva, presença de fluoreto, higiene oral, superfície dental e tempo de contato entre esta e o biofilme (FEJERSKOV e KIDD, 2011). Seu acúmulo é o principal fator etiológico dos dois maiores problemas de saúde em Odontologia: a cárie e doença periodontal (BORGHI, MOIMAZ e SALIBA, 2005).

O acúmulo de biofilme dental gera como manifestação inicial aos tecidos bucais a gengivite, podendo esta evoluir para periodontite (NANCI e BOSSHARTDT, 2000).

A cárie dentária é uma doença pertencente ao grupo de doenças multifatoriais onde há a interação de muitos fatores de risco genéticos, ambientais e comportamentais. Apresenta-se como resultado de uma mudança no biofilme da superfície dental, levando a um desequilíbrio mineral entre fluido da placa e dente e, conseqüentemente, levando a uma perda de material mineral do dente (FEJERSKOV, 2004).

O poder das plantas medicinais foi descoberto graças à necessidade do ser humano de procurar seu alimento. O uso de forma empírica fez o homem conhecer o poder das plantas medicinais na cura das mais diversas enfermidades. No Brasil, a terapêutica popular foi desenvolvida com as contribuições dos negros, indígenas e portugueses (WAGNER e WISENAUER, 2006).

Fitoterápicos são produtos obtidos a partir de plantas medicinais, ou seus derivados, exceto substâncias isoladas, com finalidade profilática, curativa ou paliativa. A cultura popular é de suma importância para o desenvolvimento de medicamentos atualmente disponíveis no mundo (BRASIL, 2011). Estes foram, há anos, sinônimo apenas de algo aliado à crença popular e sem bases científicas, no entanto, atualmente os fitoterápicos vêm sendo fonte de estudos científicos devido aos efeitos colaterais e ao alto custo dos medicamentos (ALVES e SILVA, 2003).

Libidibia ferrea Martius (Fabaceae), popularmente conhecida como jucá ou pau-ferro, é comumente encontrada no Norte e Nordeste brasileiro (MAIA, 2004; PIO, 1984) e possui propriedades terapêuticas anti-inflamatória, analgésica e antimicrobiana já comprovadas cientificamente. (CAVALHEIRO *et al*, 2009; PEREIRA *et al*, 2012; SAMPAIO *et al*, 2009).

A *Libidibia ferrea* apresenta atividade antimicrobiana frente a microrganismos presentes na cavidade bucal e por isso há uma perspectiva do seu uso como enxaguatório bucal para o controle do biofilme dental (MARREIRO *et al.*, 2014).

Diante da necessidade de se produzir um fitoterápico seguro e eficaz, faz-se necessário a análise de aspectos da matéria prima vegetal bem como da formulação em teste. Parâmetros físico-químicos têm sido estabelecidos como objetivo de garantir a qualidade da matéria prima e do produto final (ARRUDA *et al.*, 2013).

2. OBJETIVOS

Objetivo Geral

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

Objetivos Específicos

1. Realizar a caracterização físico-química, organoléptica e microbiológica do enxaguatório com e sem o extrato de *L. ferrea* em 0, 30, 60 dias, 90 e 180 dias em três condições de armazenamento (temperatura ambiente, ar condicionado e geladeira);
2. Avaliar os parâmetros físicos (pH, densidade e sedimentação) em relação ao tempo e condição de armazenamento;
3. Analisar a contaminação total e por patógenos específicos;

3. REVISÃO DE LITERATURA

3.1 Cárie e Doença Periodontal

O biofilme está constantemente presente na cavidade bucal, e este pode ser definido como uma comunidade cooperativa, bem organizada, de células microbianas aderidas a uma superfície úmida e aglomerada por matriz de polissacarídeos (NASCI-MENTO *et al.*, 2006) que forma-se sobre uma camada de proteína denominada película adquirida do esmalte a qual se forma imediatamente após a exposição da superfície dentária à saliva (VASSILAKOS *et al.*, 1993; VACCASMITH & BOWEN, 2000).

A cárie é uma doença multifatorial e polimicrobiana, o que significa que é necessário uma série de fatores, durante certo período de tempo, para que a mesma se expresse clinicamente. São necessários além dos microrganismos cariogênicos, a presença de dos outros dois fatores primários relacionados com o “hospedeiro” (tecidos dentários susceptíveis à dissolução ácida e a saliva) e com o “ambiente” (substrato adequado à satisfação das necessidades energéticas das bactérias cariogênicas, ou seja, os hidratos de carbono), tendo que permanecer, esse três fatores, conjugados por um determinado período de tempo (PEREIRA, 1993; FARGE, 1998; FEJERSKOV, 1997; WEYNE *ET AL*, 2000; SEOW, 1998).

A doença periodontal parece ocorrer quando o equilíbrio entre agressão microbiana e resposta do hospedeiro está alterado. Dessa forma, pode-se iniciar um quadro de gengivite e dependendo da resposta do hospedeiro e se esta não for tratada em um momento oportuno, esta gengivite pode evoluir para periodontite, levando conseqüentemente à inflamação e destruição progressiva dos tecidos de suporte e acometendo sistematicamente o organismo humano através de mediadores inflamatórios (CARRANZA & NEWMAN, 2011)

Existem evidências científicas de que os enxaguatórios bucais podem desempenhar um papel chave e de valor significativo como coadjuvantes, e não como substitutos, dos métodos mecânicos para prevenção e tratamento das doenças periodontais (ROJAS, SANTOS-ALEMANY, 2005).

Para se obter ação antiplaca, o agente enxaguatório antimicrobiano deve: reduzir a adesividade das bactérias à superfície dental, inibir o crescimento e proliferação dos microrganismos, inibir a formação da matriz intercelular da placa, modificar a bioquímica bacteriana para reduzir a formação de produtos citotóxicos e, modificar a ecologia do biofilme para desenvolvimento de uma flora menos patogênica (MOREIRA *et al.*, 2001).

3.2 Plantas medicinais e Fitoterapia

Muito antes do advento dos medicamentos, as plantas eram usadas como um recurso do ser humano no intuito de melhora das condições, tanto de alimentação quanto de cura, para muitas enfermidades. Os conhecimentos dos benefícios de certas plantas foram transmitidos de geração a geração e atualmente o uso de vegetais *in natura* pelas populações vem se intensificando (RATES, 2001; OLIVEIRA *et al.*, 2007).

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 (TAKEMURA, 2008), apenas 0,4% são quimicamente conhecidas (GOTLIEB *et al.*, 1996).

A fitoterapia vem difundindo em todas as áreas da saúde, incluindo na Odontologia, mostrando-se eficaz entre programas preventivos e curativos seja para o controle do biofilme dental como para outros problemas bucais. (SOYAMA, 2007) Para que um produto seja introduzido no mercado devem ser realizados estudos laboratoriais e clínicos específicos que comprovem sua eficácia proporcionando uma maior probabilidade

de aceitação por parte da população, além do fato de que a busca por novos produtos com maior atividade terapêutica, com menor toxicidade e melhor biocompatibilidade tenha aumentado (AGRA *et al*, 2007; OLIVEIRA, 2005).

As substâncias que possuem estudos mais adiantados na Odontologia são a aroeira, a própolis e a romã, devido às suas propriedades terapêuticas e pelo fato de possuírem uso bastante difundido dentro da medicina popular no tratamento de diversos problemas bucais, (GEBARA *et al* 1996; SOARES *et al.*, 2006) porém outras estão em estudo como a copaíba e o jucá.

3.3. *Libidibia ferrea*

Estudos têm sido realizados para avaliar a atividade terapêutica de plantas da Flora Amazônica contra microrganismos presentes no biofilme dental (BANDEIRA *et al*, 1999; PAIXAO, 2002; SAMPAIO *et al* 2009). A prática fitoterápica, antes utilizada pelos povos antigos, ficou por anos esquecida com o advento de medicamentos sintéticos, porém, o interesse sobre o assunto tem aumentado consideravelmente nos últimos anos (VEIGA, 2008).

No Brasil, o fruto da *Libidibia ferrea* é amplamente utilizado como um medicamento antimicrobiano e de caráter curador em várias situações, incluindo infecções orais (VIEIRA, 1992; DI STASI e HIRUMA-LIMA, 2002; BORRÁS, 2003).

Um estudo preliminar com o extrato aquoso bruto dos frutos da planta *Libidibia ferrea* foi realizado para a avaliação de propriedade anti-inflamatória e analgésica. 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. Portanto, conclui-se a partir dos resultados dos testes que o jucá possui propriedades analgésicas e anti-inflamatórias em comparação com as substâncias que são consideradas padrões para tais atividades, suportando o seu uso popular no tratamento de algumas doenças (CARVALHO 1996).

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 *C. ferrea*, entretanto, não foram observadas as atividades tóxica aguda, hemolítica, heparinásica, antibacteriana e anti-fúngica.

Pereira *et al.* (2012) avaliaram frações polissacarídicas e os extratos das vagens de *Libidibia ferrea* (*Caesalpinioideae*), quanto à atividade anti-inflamatória. Os resultados mostraram que os extratos e frações polissacarídicas de vagens de *Libidibia ferrea* exibem potente atividade anti-inflamatória através da modulação negativa de histamina, serotonina, bradicinina, prostaglandina E2 e óxido nítrico libertado no edema induzido por carragenina, demonstrando o envolvimento na degranulação dos mastócitos. As frações polissacarídicas da planta apresentam 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.

3.4 Enxaguatórios Bucais

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).

Conseguir um controle aceitável desse biofilme na maioria dos pacientes não é tarefa fácil. Neste caso, existem evidências científicas de que os enxaguatórios bucais podem desempenhar um papel chave e de valor significativo como coadjuvantes dos métodos mecânicos para prevenção e tratamento das doenças periodontais (ROJAS, SANTOS-ALEMANY, 2005).

Dentre os colutórios, a clorexidina é o padrão-ouro para o combate à placa, devido a sua boa substantividade e ação antimicrobiana contra as bactérias presentes na cavidade oral. Entretanto, seu uso também apresenta efeitos adversos como mancha dentário e alteração no paladar, sendo restrito a situações específicas (OPPERMANN *et al.*, 2010).

O uso de enxaguatórios bucais à base de substâncias químicas naturais tem sido objetivo de estudo por serem relativamente mais simples e de menor custo. Estes enxaguatórios possuem propriedades satisfatórias, contribuindo para melhorar o acesso da

população aos cuidados com a prevenção e tratamento das doenças bucais (BORGHI, MOIMAZ e SALIBA, 2005; MARINHO e ARAÚJO, 2007).

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 microrganismos 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.

Venâncio *et al.* (2015) realizaram estudos com o enxaguatório de *L. ferrea*, a fim de avaliar, *in vitro*, sua estabilidade farmacológica em três tempos experimentais: 0, 30 e 60 dias. As características avaliadas foram o controle microbiológico, características organolépticas, sedimentação, pH e densidade. Os autores concluíram que o enxaguatório à base de *Libidibia ferrea* apresentou condições de estabilidade, assim como ausência de contaminantes, sendo necessário aprofundar os estudos para uso da solução *in vivo*

MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Obtenção da matéria-prima vegetal e Preparo do extrato

A espécie botânica *Libidibia ferrea* (228.022 - INPA) foi coletada no Instituto Nacional de Pesquisa da Amazônia (INPA) e processada na Faculdade de Ciências Farmacêuticas (FCF/UFAM). O fruto da espécie *Libidibia ferrea* foi preparado da seguinte forma:

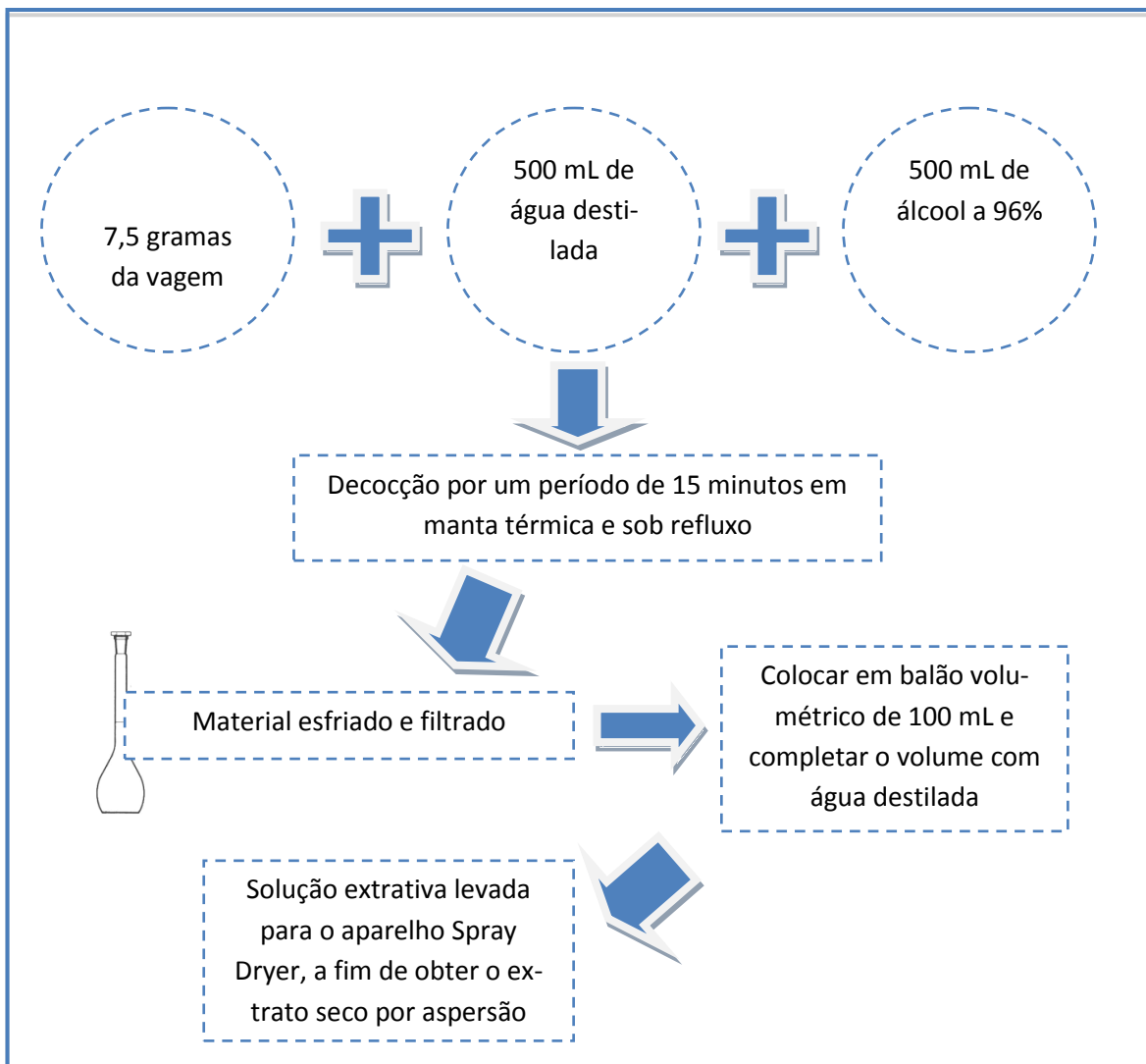


Figura 01 – Esquema do preparo do extrato seco de *Libidibia ferrea*.

4.2 Formulação do enxaguatório bucal

A formulação foi preparada baseada na concentração inibitória mínima determinada na primeira fase da pesquisa. A composição da formulação obedeceu aos mesmos padrões do mercado, porém com o princípio ativo da *Libidibia ferrea* e isenta de álcool.

Os componentes principais da formulação do enxaguatório de *Libidibia férrea* seguiu a metodologia proposta por Zanin *et al.*(2007) e Venâncio modificado (2014), exceto pelo uso de flavorizante de chocolate na formulação proposta:

Enxaguatório de jucá	
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 chocolate	0,08 mL

Quadro 1 - Componentes utilizados para a formulação de 20 mL do enxaguatório de jucá



Figura 02 – Enxaguatório de *L. ferrea*

4.3 Caracterização da formulação

Foi aferido o **pH**, através da diferença de potencial entre dois eletrodos de pH previamente calibrados com padrões adequados; **sedimentação**, utilizando-se a centrífuga em 3000 rpm durante 5 minutos, para observação de uma possível separação das fases da solução; **densidade**, definidas através das densidades no picnômetro seco, picnômetro com água e picnômetro com o enxaguatório; **estabilidade**, avaliada através das **características organolépticas** (cor, odor, brilho e consistência) para cada período experimental (0, 30 e 60, 90, 120 e 180 dias) em três condições diferentes, temperatura ambi-

ente ($30 \pm 2^\circ \text{C}$), ar refrigerado ($18 \pm 2^\circ \text{C}$) e geladeira ($5 \pm 2^\circ \text{C}$) (FARMACOPÉIA BRASILEIRA, 2010).

Os testes foram feitos em triplicada e o resultado foi a média das leituras.

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

O controle microbiológico do extrato e do enxaguatório de jucá consistiu na determinação do número total de microrganismos e pesquisa de *Salmonella* sp., *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Staphylococcus aureus*, conforme preconizados na Farmacopéia Brasileira (2010), para análise microbiológica de produtos não-estéreis, como se segue:

- Contagem total de microrganismos

Foram preparadas na proporção 1:10, onde se utilizou 100 μL do enxaguatório e 900 μL de água peptonada (Acumedia®, Estados Unidos), em seguida foram diluídas e homogeneizadas nas proporções 1:10; 1:100 e 1:1000. Após a homogeneização, foram pipetados 10 μL de cada amostra e semeadas, em triplicata, em placas de Petri contendo meios de cultura ágar Caseína-soja (Acumedia®, Estados Unidos) para bactérias e ágar Sabouraud-dextrose (Difco®, França) para leveduras, separadamente.

As placas foram incubadas a 35°C por 24 e 48 horas para determinação de bactérias no meio de cultura ágar Caseína-Soja (Acumedia®, Estados Unidos) e a 25°C durante 5 a 7 dias para determinação de fungos filamentosos e leveduras, no meio de cultura com ágar Sabouraud-dextrose (Acumedia®, Estados Unidos).

Após este período, caso houvesse colônias suspeitas, seria determinado o número de unidades formadoras de colônia (UFC/mL).

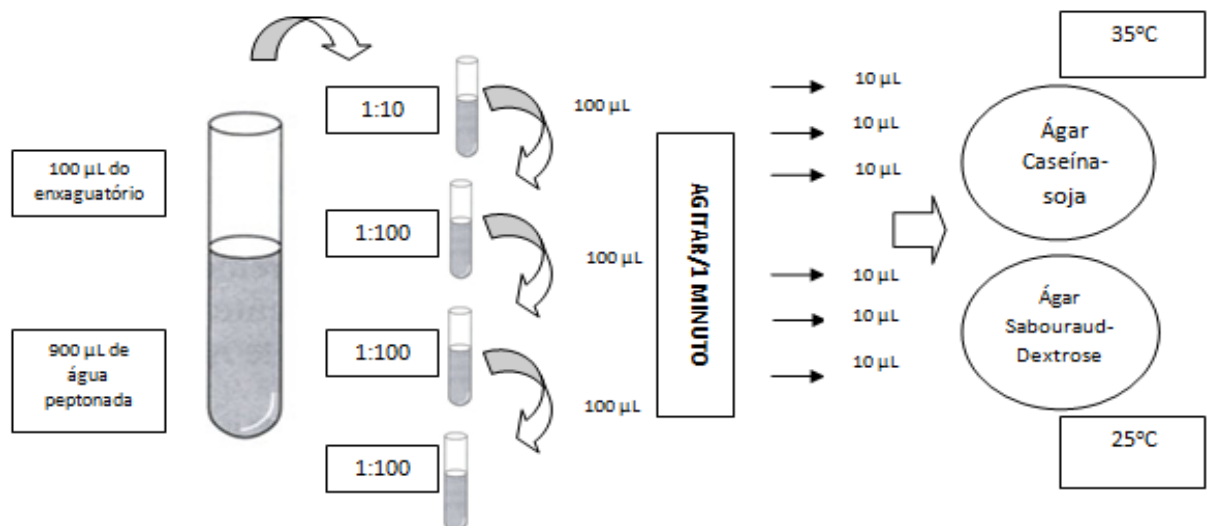


Figura 03 – Esquema para a pesquisa do número total de microrganismos - FONTE: VENÂNCIO *et al.*, 2015.

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

Para a pesquisa de *Salmonella sp* e *Escherichia coli* foi realizado o protocolo experimental descrito na Figura 08.

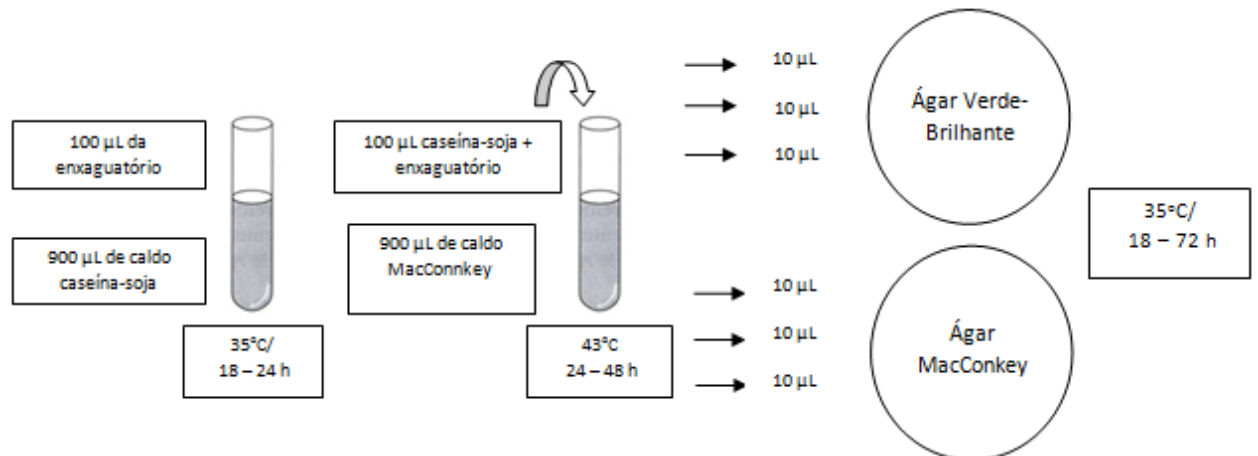


Figura 04 – Esquema para a pesquisa de *Escherichia coli* e *Salmonella sp*.- Fonte: VENÂNCIO *et al.*, 2015.

Caso houvessem colônias suspeitas, as mesmas seriam semeadas em tubo contendo ágar tríplice açúcar-ferro (TSI) e incubadas a 35°C por 24h. Após este período, caso houvessem colônias suspeitas, seria determinado o número de unidades formadoras de colônia (UFC/mL)

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

Foram transferidos, assepticamente, 100 µL do enxaguatório de *Libidibia ferrea* para 900 µL de caldo soja caseína (Acumedia®, Estados Unidos) Em seguida, foi homogeneizado e incubado a 35°C durante 18-24 horas. Após esse período, uma alíquota de 10 µL da subcultura foi semeada, em triplicata, em ágar Cetrimida (Acumedia®, Estados Unidos) incubada a 35°C durante 18-72 horas para pesquisa de *Pseudomonas aeruginosa* e 10 µL da subcultura foi semeada em Ágar sal manitol para pesquisa de *Staphylococcus aureus*. Após este período, caso houvesse colônias suspeitas, seria determinado o número de unidades formadoras de colônia (UFC/mL).

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

A busca por meios alternativos, que sejam viáveis economicamente e apresentem efetividade, impulsionaram pesquisas de métodos complementares, como a Fitoterapia. A saúde bucal, assim como várias outras áreas da saúde, é constantemente beneficiada com os sucessivos estudos que avaliam as atividades medicinais de plantas frente a microrganismos causadores de doenças como a cárie e a doença periodontal.

Por possuir propriedades terapêuticas anti-inflamatória, analgésica e antimicrobiana já comprovadas cientificamente (CAVALHEIRO *et al.*, 2009; PEREIRA *et al.*, 2012; SAMPAIO *et al.*, 2009), o jucá foi centro dos estudos de Conde (2006) e Sampaio *et al.* (2009), nos quais utilizaram extratos da espécie vegetal *L. ferrea* e os resultados demonstraram um grande potencial do Jucá sobre microrganismos do biofilme dental. Desta forma, 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.

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, 2013). No intuito de avaliar, *in vitro*, a estabilidade farmacológica de um enxaguatório a base de *Libidibia ferrea* nos períodos amostrais de 0, 30 e 60 dias, Venâncio *et al.* (2015) propuseram um estudo e concluíram que o enxaguatório apresentou condições de estabilidade, assim como ausência de contaminantes. Desta forma, o presente estudo teve a finalidade de avaliar, *in vitro*, a estabilidade farmacológica de um

enxaguatório a base de *Libidibia ferrea* em três condições de armazenamento (Temperatura ambiente, ar condicionado e geladeira) e em seis intervalos de tempo (0, 30, 60, 90, 120 e 180).

A avaliação dos caracteres organolépticos foi baseada na alteração de cor, odor, brilho e consistência. A cor e o brilho foram analisados à luz do dia. A consistência foi avaliada através do toque, observando presença ou ausência de grânulos. O odor da emulsão determinou-se primeiramente, a intensidade do odor: nenhum; fraco; distinto ou forte e, a seguir, a sensação causada pelo odor: aromático; frutoso; mofado; rançoso ou amadeirado.



Figura 04 – Imagem fotográfica representando a avaliação dos caracteres organolépticos.

A partir da análise dos caracteres organolépticos representados nos quadros 2 e 3 (Apêndice A) pode-se inferir que nos tempos 0, 30, 60 e 90 dias as características do enxaguatório foram mantidas, no entanto, o odor e brilho da amostra do ar condicionado sofreram modificações nos tempos 120 e 180 dias, assumindo um odor rançoso forte e um brilho opaco. A amostra da temperatura ambiente também assumiu as mesmas características de odor rançoso forte e brilho opaco no intervalo de 180 dias. Venâncio *et al.* (2015) e Marreiro *et al.* (2011) realizaram estudo com o mesmo enxaguatório e 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, o que corrobora com o presente estudo, visto que as modificações nas características organolépticas passaram a ocorrer a partir de 120 dias de armazenamento.

Segundo Isaac *et al.* (2008), a homogeneidade e coloração de um produto fitocosmético é de grande importância comercialmente, 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 separação do enxaguatório de *L. ferrea* nos períodos experimentais de 0, 30 e 60 dias, no entanto, no tempo 90 ocorreu a sedimentação da amostra da temperatura ambiente; no tempo 120 ocorreu separação nas amostras do ar condicionado e temperatura ambiente; e no tempo 180 ocorreu sedimentação de todas as três amostras. Venâncio *et al.* (2015) e Marreiro *et al.* (2011) não observaram sedimentação nos três períodos testados (0, 30 e 60 dias), corroborando com os resultados obtidos, visto que a modificação ocorreu a partir do intervalo de 90 dias. Isaac *et al.* (2008) afirmam que a estabilidade não é assegurada pela ausência da separação de fases, portanto, a presença de sedimentação da solução à base de *Libidibia ferrea* com o decorrer do tempo, remete à necessidade de homogeneização do enxaguatório bucal previamente ao uso, através de agitação.

Os resultados das análises de pH e densidade do enxaguatório de *L. ferrea*, nos períodos experimentais (0, 30, 60, 90, 120 e 180 dias) estão expressos na tabela 1 e gráfico 1.

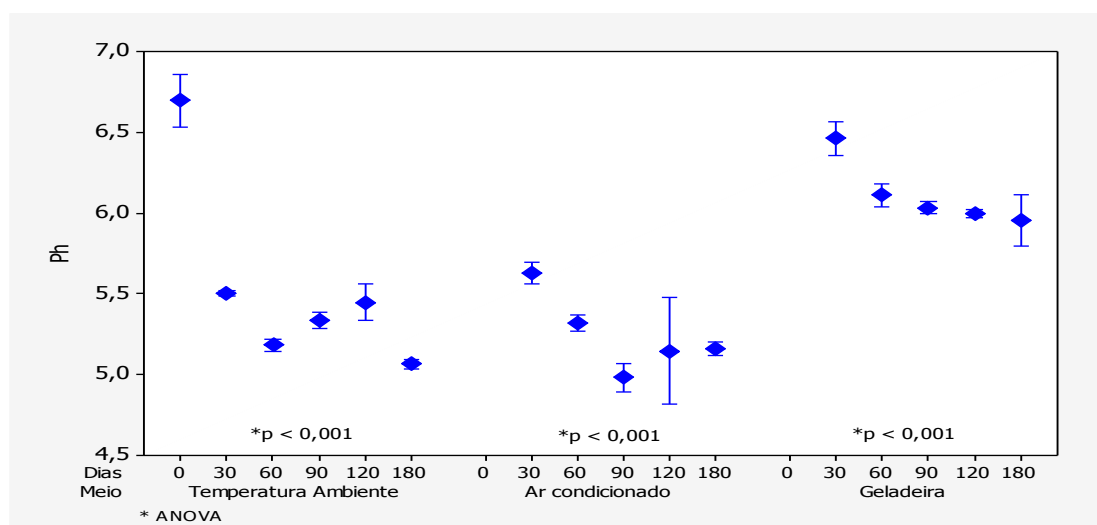


Gráfico 1- Distribuição segundo as médias do pH nos tempos 0, 30, 60, 90, 120 e 180 dias e nos ambientes: temperatura ambiente, ar condicionado e geladeira.

Grupos	Diferença de tempo (meses)																	
	30 - 0		60 - 0		90 - 0		120 - 0		180 - 0		60 - 30		90 - 60		120 - 90		180 - 120	
	Média	Dp	Média	Dp	Média	Dp	Média	Dp	Média	Dp	Média	Dp	Média	Dp	Média	Dp	Média	Dp
pH																		
Temperatura ambiente	-1,19 ^a	0,06	-1,51 ^a	0,05	-1,36 ^a	0,08	-1,18 ^a	0,04	-1,63 ^a	0,06	-0,32	0,02	0,15 ^a	0,02	0,11	0,03	-0,38 ^a	0,06
Ar condicionado	-1,07 ^a	0,07	-1,37 ^a	0,08	-1,71 ^b	0,06	-1,48 ^b	0,13	-1,53 ^a	0,08	-0,31	0,04	-0,34 ^b	0,03	0,16	0,14	0,01 ^b	0,12
Geladeira	-0,23 ^b	0,08	-0,59 ^b	0,08	-0,66 ^c	0,07	-0,63 ^c	0,01	-0,74 ^b	0,04	-0,35	0,02	-0,08 ^c	0,02	-0,04	0,01	-0,04 ^b	0,06
p*	<0,001		<0,001		<0,001		<0,001		<0,001		0,240		<0,001		0,058		0,002	
Densidade																		
Temperatura ambiente	-0,004	0,02	0,018	0,02	0,022	0,02	0,032	0,01	0,021	0,02	0,021	0,02	0,004	0,01	-0,009	0,01	0,009	0,01
Ar condicionado	0,008	0,01	0,024	0,01	0,025	0,02	0,044	0,00	0,007	0,02	0,017	0,02	0,001	0,01	-0,000	0,00	-0,018	0,01
Geladeira	0,013	0,01	0,020	0,01	0,025	0,02	0,042	0,01	0,022	0,02	0,006	0,02	0,005	0,01	-0,002	0,00	-0,001	0,01
p*	0,414		0,900		0,983		0,114		0,596		0,683		0,940		0,418		0,062	

Tabela 1. Distribuição segundo a média da diferença do pH e da densidade do enxaguatório de *L. Ferrea* nos tempos (0, 30, 60, 90, 120 e 180).

* Análise de Variância (ANOVA); Dp = desvio-padrão.

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

Analisando a Tabela e Gráfico 1, observou-se que o enxaguatório de *L. ferrea* apresentou diferença estatisticamente significativa nos valores do pH, quando comparado o tempo zero em todos os períodos experimentais ($p < 0,001$). Diferença estatisticamente significativa também foi encontrada quando os valores de pH dos tempos 60-90 ($p < 0,001$) e 120-180 dias ($p < 0,002$) foram comparados. Ao analisar os tempos experimentais em relação ao local de armazenamento, observou-se que nos tempos 30,60 e 180 dias, não houve diferença estatisticamente significativa entre temperatura ambiente e ar condicionado, porém, as mesmas diferiram da amostra em geladeira. Já as amostras de 90 e 120 dias diferiram estatisticamente entre si em todos os ambientes de armazenamento.

Nos estudos de Venâncio *et al.* (2015) e Marreiro *et al.* (2011) pode-se observar uma diferença estatisticamente significativa apenas nos tempos 0-60 dias, mostrando certa estabilidade nas demais comparações. No estudo de Marreiro *et al.* (2011), houve uma diminuição nos valores médios do pH, no entanto, no presente estudo, apesar do também declínio das médias do pH, apenas os valores das amostras armazenadas na geladeira apresentaram essa linha descendente, pois os demais ambientes apresentaram oscilações nos valores, como pode ser observado no gráfico 1.

Quando foram comparados os intervalos 60-90 e 120-180 dias, pode-se verificar que houve diferença significativa ($p < 0,001$ e $p < 0,002$, respectivamente), o que não foi observado quando comparado os tempos 30-60 e 90-120. Quanto à leitura dos valores em relação aos ambientes, não se pode constatar diferença entre os três ambientes quando comparados os tempos 30-60 e 90-120 dias. Na comparação dos tempos 60-90, houve diferença entre os três ambientes enquanto que a comparação dos tempos 120-180 dias houve uma equivalência entre os valores do ar condicionado e da geladeira diferindo da temperatura ambiente.

Os valores médios das amostras da geladeira foram os que menos sofreram modificações, se comparados com o tempo 0, permanecendo com um pH acima do pH considerado crítico para a desmineralização do esmalte, estabelecido em pH 5,5. Já as amostras das demais condições de armazenamento obtiveram uma média do pH abaixo de 5,5 no término dos 180 dias, impossibilitando seu uso neste intervalo de tempo, visto que os valores de pH ácido abaixo de 5,5 provocam uma dissolução no esmalte dental.

Quanto à densidade, os valores obtidos com o teste permitem inferir que não houve uma diferença estatisticamente significativa quando comparados os tempos 0, 30, 60, 90, 120 e 180

dias, assim como quando foram comparados as três condições de armazenamento: temperatura ambiente, ar condicionado e geladeira, como pode ser observado na tabela 1 e no gráfico 2.

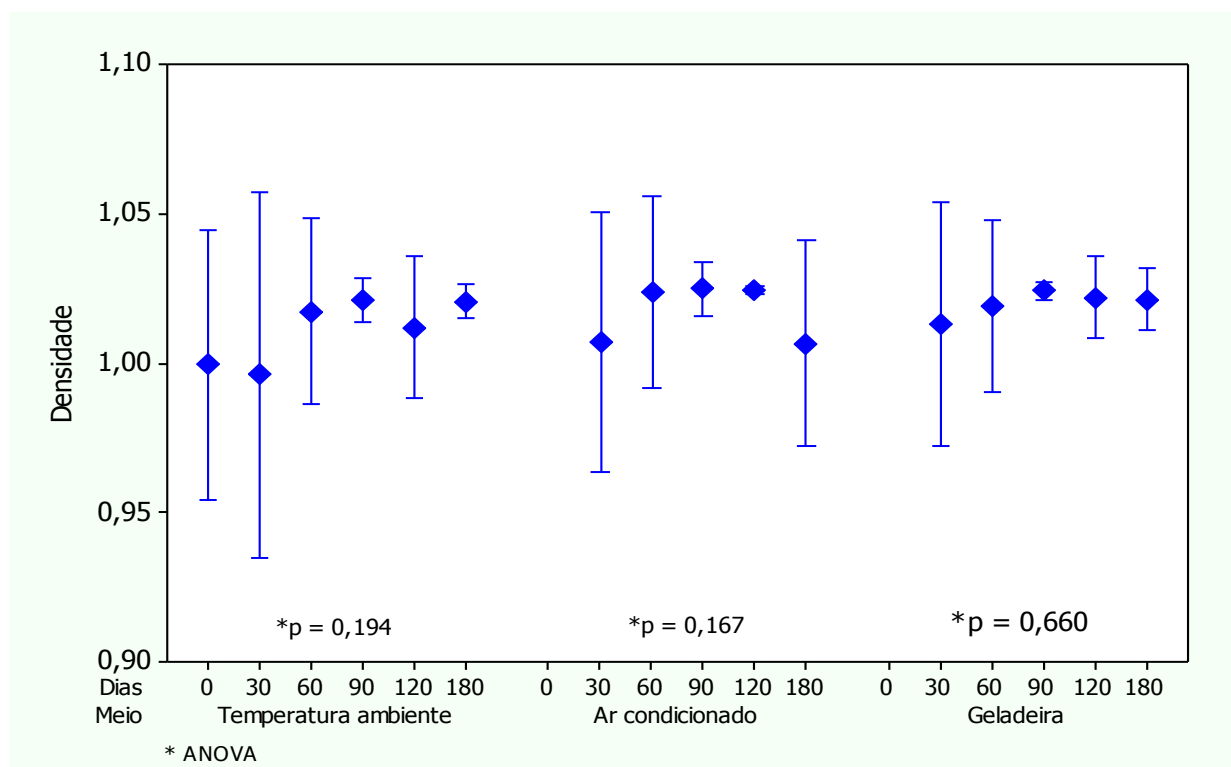


Gráfico 2. Distribuição segundo as médias da densidade nos tempos 0, 30, 60, 90, 120 e 180 dias e nos ambientes: temperatura ambiente, ar condicionado e geladeira.

Venâncio *et al.* (2015) verificaram que a variação da densidade mostrou-se aceitável nos períodos experimentais (0, 30 e 60 dias), havendo diferença estatística ao longo do tempo, quando realizado o teste de Tukey, porém ser interferir na característica final da formulação. Já Marreiro *et al.* (2011) observaram 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, sugerindo que estas variações podem ter ocorrido devido à perda de água ou mesmo pela volatilidade do enxaguatório, como descrito por Isaac *et al.*,2008.

O teste de avaliação de contaminantes foi negativo para todos os microrganismos pesquisados em todos os intervalos. Tais resultados corroboram com Venâncio *et al.* (2015) e Marreiro *et al.* (2011), visto que não houve indicação da presença de microrganismos em nenhum dos estudos. Portanto em ambos os estudos, respeitou-se o padronizado pela ANVISA (Agência Nacional de Vigilância Sanitária).

Segundo Ferreira e Souza (2007), o estudo de estabilidade é de suma importância para a padronização de produtos fitoterápicos, pois esta mostra o tempo pelo qual o fármaco retém sua integridade e pode ser afetado por fatores como temperatura, pH, luminosidade e ar, além do fato da instabilidade poder modificar três pontos primordiais: qualidade, eficácia e segurança.

5. CONCLUSÃO

Com base nos resultados pode-se concluir que:

1. O enxaguatório de *L. ferrea* apresentou condições favoráveis de estabilidade quando avaliado através das variáveis do pH, densidade, sedimentação e características organolépticas até o período experimental de 90 dias;
2. Após 90 dias de armazenamento, a formulação mostrou-se instável quanto ao pH e características organolépticas;
3. Quanto às condições de armazenamento, a geladeira apresentou a melhor estabilidade físico-química quando comparado aos outros ambientes testados;
4. Em todos os períodos e condições de armazenamento, pode-se constatar uma ausência de contaminantes.

6. REFERÊNCIAS

1. AGRA, M.F.; FREITAS, P.F.; BARBOSA-FILHO, J.M. Synopsis of the plants known as medicinal and poisonous in Northeast of Brasil. **Rev bras Farmacogn**, v.17, n.1, p.114-40, 2007.
2. ALVES, A.R.; SILVA, M.J.P. O uso da fitoterapia no cuidado de crianças com até cinco anos em área central e periférica da cidade de São Paulo. **Rev Esc Enferm USP**, v.37, n.4, p.85-91, 2003.
3. ANDREOLLI, R.T.; LARA, E.H.G. Avaliação *in vitro* da eficácia de enxaguatórios bucais remineralizantes. **Infarma**, v.16, n.7-8, p.58-63, 2004.
4. ARRUDA, A.O.; GALVÃO, M.A.M.; FERREIRA, RANDAU KP, SOARES LAL. Avaliação de parâmetros de qualidade físico-químicos do fruto e casca de *Libidibia ferrea* Martius (jucá). Disponível em: <HTTP://<http://www.inovacaoterapeutica.com.br/trabalhos/730fa865697aff99ad0a1de93cd4fb66.pdf>. Acesso em: 03. março, 2014.
5. BANDEIRA, M.F.C.L. Estudo farmacológico preliminar de *Copaifera multijuga* (óleo de copaíba). **J Bras Clin Estet Odontol**, v.3, p.39-41, 1999.
6. BORGHI, W.M.M.C.; MOIMAZ, S.A.S.; SALIBA, N.A. Métodos alternativos para higienização bucal e terapêutica odontológica. **Rev Inst Ciênc Saúde**, v.23, n.4, p.309-14, out/dez, 2005.
7. BORRÁS, M.R.L. **Plantas da Amazônia: Medicinais ou mágica?—Plantas comercializadas no mercado Adolpho Lisboa**. Editora Valer/Governo do Estado do Amazonas, Manaus, 2003.
8. BRASIL. **Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Formulário de Fitoterápicos da Farmacopéia Brasileira / Agência Nacional de Vigilância Sanitária**. Brasília: Anvisa, 2011. 126p.
9. CARRANZA, J.R.; NEWMAN, M.G. **Periodontia clínica**. 11a ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2011.
10. CARVALHO, J.C.T. *et al.* Preliminary studies of analgesic and anti-inflammatory properties of *Caesalpinia ferrea* crude extract. **J Ethnopharmacol**, v.53, p.175-178, 1996.
11. CAVALHEIRO, M.G. *et al.* Atividades biológicas e enzimáticas do extrato aquoso de sementes de *Caesalpinia ferrea* Mart., Leguminosae. **Rev. Bras. Farmacogn**, v.19, n.2B, p.586-91, abr/jun, 2009.

12. 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.
13. DI STASI, L.C.; HIRUMA-LIMA, C.A. **Plantas medicinais na Amazônia e na Mata Atlântica.** Unesp, São Paulo, 2002.
14. FARGE, P. Recent findings in the etiopathogenesis of caries. **Arch Pediatr**, v.5, p.1140-4, 1998.
15. **FARMACOPÉIA BRASILEIRA.** 5. ed. Vol I: Brasília. 2010.
16. FEJERSKOV, O. Changing paradigms in concepts on dental caries: consequences for oral health care. **Caries Res**, v.30, n.3, p.182-91, mai/jun, 2004.
17. FEJERSKOV, O. Concepts of dental caries and their consequences for understanding the disease. **Community Dent Oral Epidemiol**, v.25, n.5, p.5-12, 1997.
18. FEJERSKOV O; KIDD E. **Cárie dentária: A doença e seu tratamento clínico.** São Paulo: Santos, 2011.
19. FERREIRA, A.O.; SOUZA, G.F. **Preparações orais líquidas.** 2ed. São Paulo: Pharmabooks, 2007.
20. GEBARA, E.C.E.; ZARDETTO, C.G.C.; MAYER, M.P.A. Estudo *in vitro* da ação antimicrobiana de substâncias naturais sobre *S. mutans* e *S. sobrinus*. **Ver Odontol Univ São Paulo**, v.10, n.4, p.251-6, 1996.
21. GOTTLIEB, O.R.; KAPLAN, M.A.C.; BORIM, M.R.M.B. **Biodiversidade. Um enfoque químico - biológico.** Rio de Janeiro: Editora da UFRJ, 1996. 267p.
22. ISAAC, VLB. et al. Long-term evaluation of periodontal therapy: Response to 4 therapeutic modalities. **J Periodontol**, v.67, n.2, p.93-102, 1996.
23. MAIA, G.N. **Caatinga: árvores e arbustos e suas utilidades.** São Paulo: D&Z Computação Gráfica, Leitura & Arte, 2004.
24. MARINHO, B.V.S.; ARAÚJO, A.C.S. Uso dos enxaguatórios bucais sobre a gengivite e biofilme dental. **Int. J Dent**, v.6, n.4, p.124-131, out/dez, 2007.
25. MARREIRO, R.O. **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.
26. MARREIRO, R.O. et al. Evaluation of the stability and antimicrobial activity of an ethanolic extract of *Libidibia ferrea*. **Clin Cosmet Investig Dent**, v.6, p.1-5, 2014.
27. MOREIRA, N.A.; FERREIRA, R.C.; VIEIRA, P.A.; VALADARES, H.A.C. Agentes antimicrobianos no controle da placa supragingival parte I. **Arq Odontol**, v.37, n.1, p.87-89, 2001.
28. NANJI A.; BOSSHARTDT, D.D. Structure of periodontal tissues in health and disease. **Periodontol 2000**, v.40, p.11-28, 2006.
29. NASCIMENTO, D.F.F.; SILVA, A.M.; MARCHINI, L. O papel das bactérias orais em doenças sistêmicas. **Rev ABO Nac**, v. 14, n. 2, p. 117-122, 2006.
30. OLIVEIRA, F.Q.; GOBIRA, B.; GUIMARÃES, M.; BATISTA, J.; BARRETO, M.; SOUZA, M. Espécies vegetais indicadas na Odontologia. **Revbrasfarmacogn**, v. 17, n. 3, p. 466-476, 2007.
31. OLIVEIRA, M.F.S. Fitoterapia e Biodiversidade no Brasil: saúde, cultura e sustentabilidade. **Revista Ideas Ambientales**, v.1, n.1, abr, 2005.
32. OPPERMANN, R.V.; HAAS, N.A.; VILLORIA GERMAN, E.M.; PRIMO, L.G.; SERRA-NEGRA, J.M.; FERREIRA, E.F. Proposal for the teaching of the chemical control of supragingival biofilm. **Braz Oral Res**, v.24, n.1, 2010.
33. PAIXÃO, C.C.B. Uso de plantas medicinais em pacientes portadores de afecções bucais. **Odontologia Clínica-científica**, v.1, p.1-4, 2002.

34. PASSALINI, Paula. *et al.* Preventive effect of fluoridated orthodontic resins subjected to high cariogenic challenges. **Braz Dent Ribeirão Preto**, v.21, n.3, 2010.
35. PEREIRA L.P, *et al.* Polysaccharide fractions of *Caesalpinia ferrea* pods: Potential anti-inflammatory usage. **J Ethnopharmacol**, v.139, p.642-48, 2012.
36. PEREIRA, A. **Cárie Dentárias. Etiologia, Epidemiologia e Prevenção**. Medisa ed. Porto; 1993
37. PIO,C.M.**Dicionário das plantas úteis do Brasil e das exóticas cultivadas**. Rio de Janeiro: Imprensa Nacional, p. 490-492, 1984.
38. RATES, S.M.K. Plants as source of drugs. **Toxicon**, v. 39, p. 603-613, 2001.
39. ROJAS,F.J.E.; SANTOS-ALEMANY, A. Colutorios para elcontrol de placa y gingivitisbasadosenla evidencia científica. **Rev ilutreConsGenColOdontólEstomatól**, v.10, n.4, p.445-52, 2005.
40. SAMPAIO, Fábio C. *et al.* *In vitro* antimicrobial activity of *Caesalpinia ferrea* Martius fruits against oral pathogens. **J Ethnopharmacol**, v.124, n.2, p.289-94, jul, 2009.
41. SEOW, W.K. Biological mechanisms of early childhood caries. **Community Dent Oral Epidemiol**, v.26, p.8-27, 1998.
42. SOARES,D.G.S.; OLIVEIRA,C.B.; LEAL, C; DRUMOND,M.R.S.; PADILHA,W.W.N. Susceptibilidade *in vitro* de bactérias bucais a tinturas fitoterápicas. **Ver OdontoCiênc**, v.21, n.53, p.232-7, 2006.
43. SOYAMA, P. Plantas medicinais são pouco exploradas pelos dentistas. **Cienc Cult**. V.59, n.1, p.12-3, 2007.
44. TAKEMURA,O.S. Tendência nos estudos de plantas medicinais. **ArqCiênc Saúde Unipar**, v.12, n.3, 165-274, set/dez, 2008.
45. VACCASMITH, A.M.; BOWEN, W.H. In situ studies of pellicle formation on hydroxyapatite discs. **Arch Oral Biol**, v.45, p.277-291, 2000.
46. VASSILAKOS, N; ARNEBRANT, T; GLANTZ, P-O. An *in vitro* study of salivary film formation at solid/liquid interfaces. **Scand J Dent Res**, v.101, p.133-7, 1993.
47. VEIGA-JUNIOR,V.F.; MELLO,J.C.P. As monografias sobre plantas medicinais. **Rev Bras Farmacogn**, v.18, p.464-471, 2008.
48. VENÂNCIO, Gisely Naura. *et al.* Herbal mouthwash based on *Libidibia ferrea*: microbiological control, sensory characteristics, sedimentation, pH and density.**Rev Odontol UNESP**, v.44, n.2, p.118-24, mar/abr, 2015.
49. VIEIRA, L.S. **Fitoterapia da Amazônia: Manual das Plantas Medicinais**. Agronomica Ceres, São Paulo.
50. WAGNER, Hildebert; WISENAUER,Markus. **Fitoterapia – Fitofármacos, Farmacologia e Aplicações Clínicas**. 2.ed. São Paulo: Pharmabooks, 2006.
51. WEYNE, S. Cariologia. In: Baratieri LN, e col, editors. **Dentística. Procedimentos preventivos e restauradores**. 2ª ed. Santos Livrariaed; 2000.
52. ZANIN, S.M.W. *et al.* Enxaguatório bucal: principais ativos e desenvolvimento de fórmula contendo extrato hidroalcoólico de *Salvia officinalis* L. **Visão Acadêmica**, v.8, n.1,p.19- 24, 2007.

APÊNDICE A

	Tempo 0			Tempo 30			Tempo 60		
	TA	Ar	Gel	TA	Ar	Gel	TA	Ar	Gel
Odor	Amadeirado forte	Amadeirado forte	Amadeirado forte	Amadeirado forte	Amadeirado forte	Amadeirado forte	Amadeirado forte	Amadeirado forte	Amadeirado forte
Consistência	Líquida sem grânulos	Líquida sem grânulos	Líquida sem grânulos	Líquida sem grânulos	Líquida sem grânulos	Líquida sem grânulos	Líquida sem grânulos	Líquida sem grânulos	Líquida sem grânulos
Cor	Marrom	Marrom	Marrom	Marrom	Marrom	Marrom	Marrom	Marrom	Marrom
Brilho	Brilhoso	Brilhoso	Brilhoso	Brilhoso	Brilhoso	Brilhoso	Brilhoso	Brilhoso	Brilhoso

Quadro 02 – Resultados dos caracteres organolépticos (odor, consistência, cor e brilho) do enxaguatório de *L. ferrea*, nos seis tempos amostrais (0, 30 e 60 e dias), dispostos em três condições de armazenamento (Temperatura ambiente, ar condicionado e geladeira). Legenda: TA - Temperatura Ambiente; Ar – Ar condicionado; Gel – Geladeira.

	Tempo 90			Tempo 120			Tempo 180		
	TA	Ar	Gel	TA	Ar	Gel	TA	Ar	Gel
Odor	Amadeirado forte	Amadeirado forte	Amadeirado forte	Amadeirado forte	Rançoso forte	Amadeirado forte	Rançoso forte	Rançoso forte	Amadeirado forte
Consistência	Líquida sem grânulos	Líquida sem grânulos	Líquida sem grânulos	Líquida sem grânulos	Líquida sem grânulos	Líquida sem grânulos	Líquida sem grânulos	Líquida sem grânulos	Líquida sem grânulos
Cor	Marrom	Marrom	Marrom	Marrom	Marrom	Marrom	Marrom	Marrom	Marrom
Brilho	Brilhoso	Brilhoso	Brilhoso	Brilhoso	Opaco	Brilhoso	Opaco	Opaco	Brilhoso

Quadro 03 – Resultados dos caracteres organolépticos (odor, consistência, cor e brilho) do enxaguatório de *L. ferrea*, nos seis tempos amostrais (90, 60 e 90 e dias), dispostos em três condições de armazenamento (Temperatura ambiente, ar condicionado e geladeira). Legenda: TA - Temperatura Ambiente; Ar – Ar condicionado; Gel – Geladeira.