



## FORMULÁRIO PARA RELATÓRIO FINAL

### 1. Identificação do Projeto

#### Título do Projeto PIBIC/PAIC

AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA E CONTROLE DE QUALIDADE DE UMA FORMULAÇÃO A BASE DE *Libidibia ferrea* APÓS ENVELHECIMENTO

#### Orientador

Nikeila Chacon de Oliveira Conde

#### Aluno

Amanda Luzia Moreira Souza

### 2. Informações de Acesso ao Documento

#### 2.1 Este documento é confidencial?

SIM  NÃO

#### 2.2 Este trabalho ocasionará registro de patente?

SIM  NÃO

#### 2.3 Este trabalho pode ser liberado para reprodução?

SIM  NÃO

#### 2.4 Em caso de liberação parcial, quais dados podem ser liberados? Especifique.

### 3. Resumo

A Fitoterapia constitui um método terapêutico utilizado para a prevenção e tratamento de doenças. Dentre a grande biodiversidade de plantas medicinais, a *Libidibia ferrea* (*L.ferrea*), conhecida como Jucá, é bastante utilizada por conter diversas propriedades terapêuticas. O objetivo deste estudo foi avaliar *in vitro* a estabilidade farmacológica de um enxaguatório bucal fitoterápico à base do extrato de *L.ferrea* após envelhecimento, estabelecendo suas características organolépticas e microbiológicas. Os testes de estabilidade (cor, odor, brilho e consistência), pH,



sedimentação e densidade do enxaguatório foram realizados com as soluções armazenadas após 24 meses. Realizou-se o controle de contaminantes, através da determinação do número total de microrganismos e pesquisa de *Salmonella sp.*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Staphylococcus aureus*. Analisou-se a atividade antimicrobiana da formulação frente a microrganismos presentes no biofilme dental: *Streptococcus mutans*, *Streptococcus salivarius*, *Lactobacillus casei* e *Candida albicans* pela técnica de microdiluição em caldo, determinando-se a concentração inibitória mínima da formulação. Os resultados obtidos foram avaliados através da estatística descritiva. Os resultados demonstraram como caracteres organolépticos, a coloração na cor “Cerâmica”, com consistência fluida, aspecto brilhante e odor forte de aroma de menta. Na sedimentação observou-se separação de fases e as análises de pH e densidade apresentaram como média o valor de 5,46 e 1,029 g/cm<sup>3</sup>, respectivamente. O teste de avaliação de contaminantes foi negativo para todos os microrganismos pesquisados, tanto 24 meses, quanto 30 meses após a formulação. Os resultados mostraram que o enxaguatório apresentou atividade bactericida/fungicida frente a todos os microrganismos testados em todas as concentrações para os microrganismos *S.mutans* e *C.albicans* e nas concentrações 0,5 mg/ml para o *S.salivarius* e 0,6 mg/ml para *L.casei*. Portanto, concluiu-se que após 24 meses de formulação do enxaguatório bucal à base de *L. ferrea* suas características iniciais mantiveram-se estáveis com exceção da homogeneidade e pH da solução, apresentando ainda condições de estabilidade e qualidade sem contaminantes do produto e atividade bactericida e fungicida frente aos microrganismos do biofilme dental.

Palavras chave: Controle de qualidade; Enxaguatórios bucais; Medicamentos fitoterápicos.

#### 4. Introdução

As infecções periodontais e a cárie dentária, doenças induzidas pelo acúmulo do biofilme bacteriano, são indiscutivelmente as patologias infecciosas mais comuns na cavidade bucal (FERREIRA *et al.*, 2013).

O biofilme dental pode ser conceituado como um depósito não calcificado, composto por um aglomerado de microrganismos que se encontram firmemente



aderido aos dentes, cálculos e outras superfícies da cavidade bucal (LASCALA, 1997; MARINHO e ARAÚJO, 2007). Sua atividade depende de fatores como a dieta, saliva, presença de fluoreto, higiene oral, superfície dental e o tempo de contato entre este e o biofilme (KIDD e FEJERSKOV, 2011).

A doença periodontal é uma infecção crônica caracterizada por processo inflamatório destrutivo do tecido de suporte dos dentes (BENSO e OTUKI, 2012). Em estágio avançado, afeta estruturas mais profundas, resultando em reabsorção das fibras colágenas, do ligamento periodontal, osso alveolar, abscessos, aumento da profundidade das bolsas, mobilidade dentária e perda de dentes (SCANNAPIECO, 2004).

A cárie dentária é definida como uma doença multifatorial, cuja a interação das bactérias com substratos presentes no elemento dental resulta em um contínuo processo de desmineralização e remineralização do tecido dentário (FEJERSKOV, 2004; KIDD e FEJERSKOV, 2011).

O controle do biofilme e das patologias decorrentes da sua presença pode ser realizado através de procedimentos mecânicos, químicos ou através da dieta (BUGNO *et al.*, 2006; MOREIRA *et al.*, 2008). O estudo de compostos e extratos de produtos naturais tem sido realizado visando a obtenção de agentes antimicrobianos que possibilitem a prevenção e o tratamento dessas patologias (ROCHA *et al.*, 2013). O uso de medicamentos feitos à base de produtos naturais é resultado do acúmulo proveniente de conhecimentos por parte dos primórdios dos seres humanos, os quais perceberam os efeitos curativos dos vegetais, notando que de alguma forma a utilização destes proporcionava a recuperação da saúde do indivíduo (BORBA; MACEDO, 2006; ALEXANDRE *et al.*, 2005).

Dentre a grande biodiversidade de plantas medicinais utilizadas, a *Libidibia ferrea* (*L. ferrea*), conhecida popularmente como jucá ou pau de ferro, é bastante utilizada na Odontologia e na medicina popular, por conter propriedades terapêuticas anti-inflamatória, analgésica e antimicrobiana (OLIVEIRA *et al.*, 2013; 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 microrganismos presentes na cavidade bucal (MARREIRO, 2011; MARREIRO *et al.*, 2014).



Devido a necessidade de se produzir um produto fitoterápico seguro e eficaz, faz-se necessário a análise de alguns aspectos da matéria prima vegetal e da formulação. Para isso, foram estabelecidos parâmetros físico-químicos a serem analisados para garantir a qualidade da matéria prima vegetal (ARRUDA *et al.*, 2014).

## 5. Objetivos

### Objetivo Geral

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

### Objetivos Específicos

1. Realizar a caracterização físico-química, organoléptica e microbiológica do extrato e do enxaguatório de *L. ferrea*;
2. Determinar a atividade antimicrobiana do extrato e do enxaguatório de *L. ferrea* frente a microrganismos presentes no biofilme bucal.

## 6. Revisão de Literatura

### 6.1 Cárie e Doença Periodontal

A cárie dentária e a doença periodontal estão entre as patologias mais comuns da cavidade oral (FERREIRA *et al.*, 2013), que têm a formação do biofilme dental o seu principal fator etiológico (DECKER *et al.*, 2014). É exatamente por isso, que considera-se como chave principal para a prevenção das doenças periodontais e da cárie, o controle regular do biofilme microbiano, que pode ser realizado por meio de métodos mecânicos, químicos ou associação de ambos (FERREIRA *et al.*, 2013).

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 (NASCIMENTO *et al.*, 2006). Sua desorganização é primariamente realizada através da escovação associada ao uso de flúor; no entanto, se esse controle apresentar falhas, métodos auxiliares, como a utilização de agentes químicos, em cremes dentais ou em soluções para bochecho, podem contribuir diminuindo o número de microrganismos responsáveis pelo aparecimento e



progressão de problemas bucais (AGARWAL e NAGESH, 2011; GHASEMPOUR *et al.*, 2013).

A cárie dentária é uma doença pertencente ao grupo de doenças multifatoriais onde há a interação de fatores 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).

A doença periodontal ocorre 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 está sendo tratada ou não, pode evoluir para periodontite, levando conseqüentemente à inflamação e destruição progressiva dos tecidos de suporte e acometendo sistematicamente o organismo humano (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).

## 6.2 Plantas medicinais e Fitoterapia na Odontologia

O uso de plantas é uma prática comum ao longo do tempo. Por longos períodos o uso de plantas medicinais foi presente não só devido ao seu caráter alimentar, mas também às suas propriedades de cura, sejam elas reais ou ritualísticas (GUPTA *et al.*, 2008).

Medicamentos fitoterápicos, ou fitomedicamentos, são preparações vegetais padronizadas que consistem de uma mistura complexa de substâncias presentes na planta, preparados adequadamente e posteriormente prescritos em obediência à legislação vigente. Estes, podem ser utilizados nas mais variadas formas, como cápsulas, comprimidos, géis, pomadas, soluções aquosas, soluções hidroalcoólicas e infusões, que são conhecidas como chás (FRANCISCO, 2010).

Na odontologia, apesar do uso da fitoterapia ser milenar, a utilização de plantas medicinais para tratar doenças bucais ou para tratar doenças sistêmicas com manifestações bucais ainda é pouco explorada (OLIVEIRA *et al.*, 2007). Entretanto, nos últimos anos as pesquisas relacionadas aos produtos naturais cresceram



significativamente frente ao aumento pela busca por produtos com menor toxicidade, maior atividade farmacológica e biocompatíveis, além de custos mais acessíveis à população (FRANCISCO, 2010).

Estudos que utilizaram chás de plantas mostraram que estas infusões podem ser utilizadas para inibir o crescimento bacteriano e a aderência nas superfícies dentais, redução na produção de ácidos e polissacarídeos extracelulares (FRANCISCO, 2010).

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.

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 totalmente (TAKEMURA, 2008).

### 6.3 *Libidibia ferrea*

A prática fitoterápica, antes utilizada pelos povos antigos, ficou por anos esquecida após surgimento de medicamentos sintéticos, porém, o interesse sobre o assunto tem aumentado consideravelmente nos últimos anos (VEIGA JR, 2008).

Algumas espécies de plantas tem despertado o interesse na área da odontologia. Estas, são utilizadas pela população para o tratamento de manifestações bucais devido suas propriedades terapêuticas. Dentre elas destaca-se a *L. ferrea*, conhecida como jucá ou pau de ferro, que pode ser encontrada principalmente nas regiões Norte e Nordeste. É bastante utilizada na medicina popular por apresentar propriedades terapêuticas anti-inflamatória, analgésica, antimicrobiana e antitérmica, o que justifica o interesse de pesquisadores por esta planta (CAVALHEIRO *et al.*, 2009; PEREIRA *et al.*, 2012; SAMPAIO *et al.*, 2009, CONDE *et al.*, 2016).

A *L. ferrea* tem utilização relevante no estado do Rio Grande do Norte, o pó da casca é bastante usado pela população para o tratamento de feridas cutâneas. Assim, a utilização e comercialização da farinha de diversos tecidos, como por



exemplo, a casca da *L. ferrea* para aplicações na medicina popular, desperta o interesse para estudos biotecnológicos e farmacológicos (SAMPAIO *et al.*, 2009).

Pereira *et al.*(2012) avaliaram frações polissacarídicas e os extratos das vagens de *Libidibia ferrea*, quanto à atividade anti-inflamatória. Os resultados mostraram que os extratos e frações polissacarídicas de suas vagens 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.

#### 6.4 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).

Dentre os antissépticos, o mais utilizado e testado no controle do biofilme bacteriano, é a clorexidina, pois esta substância tem-se mostrado a mais eficaz no controle químico devido suas propriedades bacteriostáticas e bactericidas(BRITO *et al.*, 2009).

A utilização de enxaguatórios orais à base de plantas medicinais é uma alternativa bem interessante do ponto de vista econômico, facilitando o acesso da população a terapias alternativas que possam efetivamente combater o controle do biofilme bacteriano e, conseqüentemente, a formação de cáries e doença periodontal (BUSSADORI, 2013).

Conde *et al* (2016) avaliaram a atividade antimicrobiana *in vitro* de plantas da Amazônia, entre elas a *L. ferrea*, sobre microrganismos 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.



Marreiro *et al.*(2014) e Marreiro *et al.* (2014a) e 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*.

### 6.5 Legislação para Controle de qualidade dos produtos fitoterápicos

A garantia do uso seguro e eficaz de fitoterápicos envolve análises físico-químicas e microbiológicas de matérias-primas e do produto acabado, como etapa preliminar para alcançar um padrão de qualidade necessário a um medicamento. Embora diversos estudos tenham demonstrado a necessidade de garantir segurança aos produtos de origem vegetal (BRANDÃO *et al.*, 2002; MELO *et al.*, 2004), a aplicação e a validação de métodos analíticos para matérias-primas a base de plantas ainda são escassos na literatura (OLIVEIRA, 2005).

As atividades do controle de qualidade possuem a finalidade de garantir que os ensaios necessários e essenciais sejam executados e que os materiais/ Produtos Tradicionais Fitoterápicos não sejam liberados para uso ou venda até que sua qualidade tenha sido julgada satisfatória RDC 13/2013 (BRASIL, 2013).

A ANVISA, por meio da Resolução RDC 89/2004(BRASIL, 2004), publicou uma lista de fitoterápicos de registro simplificado e buscou estabelecer a padronização de marcadores químicos para diversas plantas e limite diário para seu uso. Entende-se esta preocupação como etapa fundamental para assegurar o uso e garantir eficácia ao fitoterápico. Buscando atuar neste contexto, a necessidade de determinar o teor de princípios ativos em matérias-primas vegetais, procedimentos de controle de qualidade de plantas medicinais devem ser realizados e envolvem, numa primeira etapa, análises macroscópicas e microscópicas que visam à identificação e análise do grau de pureza das mesmas (CHOI *et al.*, 2002). Acredita-se, entretanto, que por meio de análises quantitativas como etapa obrigatória na avaliação dos produtos vegetais pode-se alcançar a qualidade farmacêutica dos fitoterápicos.



A avaliação de Produtos Tradicionais Fitoterápicos deve abranger todos os fatores relevantes, incluindo: as condições de produção, os resultados de controle em processo, a documentação de fabricação, incluindo a embalagem, o cumprimento das especificações para o produto acabado e a análise da embalagem final. RDC 13/2013(BRASIL, 2013).

Com relação à estabilidade de produtos farmacêuticos, esta depende de fatores ambientais como temperatura, umidade e luz, e de outros relacionados ao próprio produto como propriedades físicas e químicas de substâncias ativas e excipientes farmacêuticos, forma farmacêutica e sua composição, processo de fabricação, tipo e propriedades dos materiais de embalagem, visando definir seu prazo de validade e período de utilização em embalagem e condições de armazenamento especificadas (BRASIL, 2005).

## **7. Metodologia**

O estudo em questão, foi continuidade do estudo de Venâncio *et al.* (2015) em que avaliou as propriedades físico-químicas do extrato e do enxaguatório a base de *L. ferrea* em tempo 0, 30 e 60 dias.

Desta forma, as etapas de coleta de matéria prima vegetal, preparo do extrato e da formulação já tinham sido cumpridas, uma vez que foi analisado as soluções preparadas para a pesquisa de 2012, porém após o envelhecimento.

### **7.1 Obtenção da matéria-prima vegetal**

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).

### **7.2 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.

### 7.3 Formulação do enxaguatório bucal

A solução do extrato seco da planta foi preparada baseada na concentração inibitória mínima determinada na pesquisa de Marreiro (2014). 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).

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
Óleo de hortelã	0,08 mL
Hidróxido de Sódio 10%	q.s.p. pH # 6,3 (1 gota/ mL)

Tabela 01- Componentes utilizados para a formulação de 20 mL do enxaguatório de *L. ferrea*.

### 7.4 Caracterização da formulação

Os testes de caracterização da formulação do enxaguatório foram realizados com as soluções armazenadas após 24 meses e 30 meses da formulação.

#### 7.4.1 Aferição do pH

O pH do enxaguatório de *Libidibia ferrea* foi aferido através do uso do peagâmetro. A determinação do pH foi realizada pela medida da diferença de



potencial entre dois eletrodos previamente calibrados com padrões adequados, imersos na solução em exame (FARMACOPÉIA BRASILEIRA, 1988).

#### 7.4.2 Teste de sedimentação

Baseou-se na velocidade rotativa de tubos de ensaio contendo o enxaguatório, utilizando-se a centrífuga em 3000 rpm durante 5 minutos, para observação de uma possível separação das fases da solução.

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

A densidade do enxaguatório foi determinada seguindo a Farmacopéia Brasileira (1988). Foram definidas as densidades no picnômetro seco, picnômetro com água e picnômetro com o enxaguatório.

#### 7.4.4 Estudo da estabilidade do enxaguatório

Foram avaliadas, correspondentes ao tempo de 24 meses, as características organolépticas (cor, odor, brilho e consistência). A solução foi armazenada ao abrigo da luz e da umidade, em geladeira ( $5 \pm 2^\circ \text{C}$ ). Os testes foram feitos em triplicata e utilizou-se como resultado as médias das leituras.

#### 7.5 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, utilizando 100  $\mu\text{L}$  do enxaguatório e 900  $\mu\text{L}$  de água peptonada (Acumedia®, Estados Unidos), em seguida diluídas e homogenizadas nas proporções 1:10; 1:100 e 1:1000. Após a homogeneização, foram pipetados 10  $\mu\text{L}$  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).

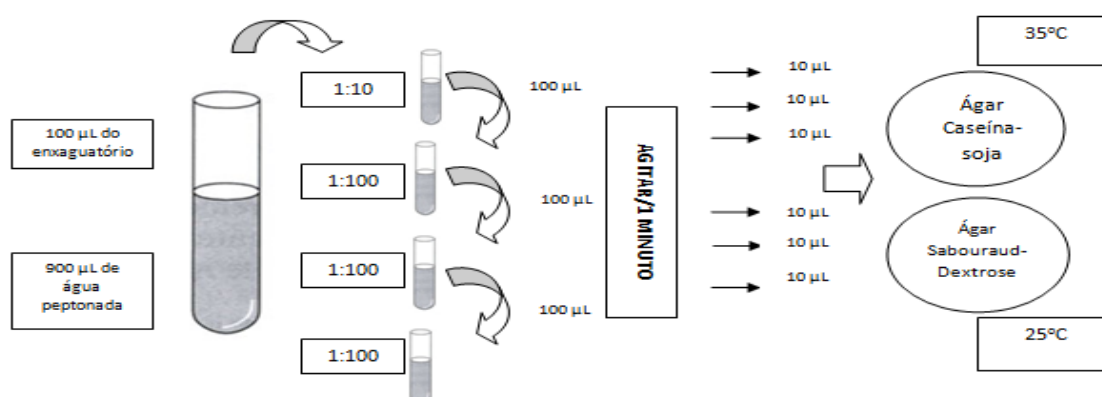


Figura 01 – Esquema para a pesquisa do número total de microrganismos - FONTE: VENÂNCIO, 2014.

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

Para a pesquisa de *Salmonella sp* e *Escherichia coli* foi realizado o protocolo experimental descrito na Figura 02.

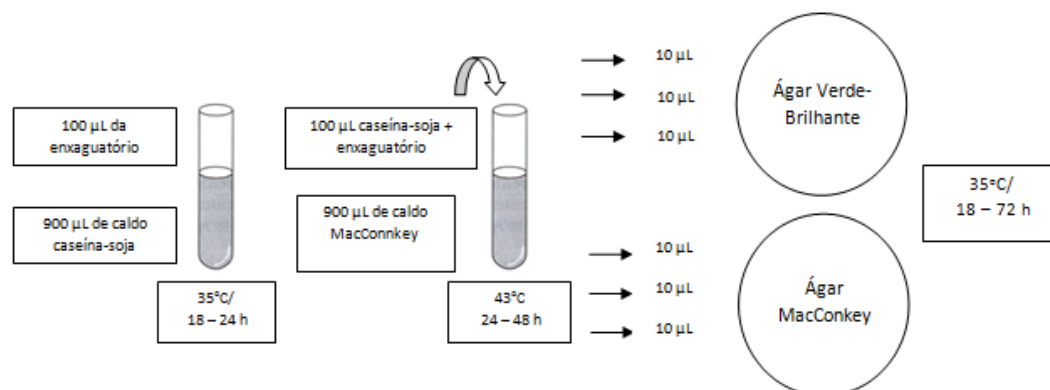


Figura 02 – Esquema para a pesquisa de *Escherichia coli* e *Salmonella sp*. - Fonte: VENÂNCIO, 2014.

Caso houvesse colônias suspeitas, as mesmas seriam semeadas em tubo contendo ágar tríplice açúcar-ferro (TSI) e incubadas a 35°C por 24h. Após este período, 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*

*aeruginosae* 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).

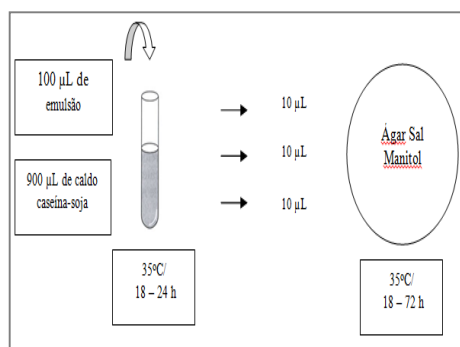


Figura 03- Esquema para a pesquisa de *Staphylococcus aureus*.- FONTE: VENÂNCIO, 2014.

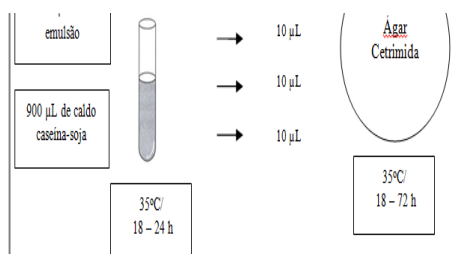


Figura 04 - Esquema para a pesquisa de *Pseudomonas aeruginosa* - FONTE: VENÂNCIO, 2014.

## 7.6 Avaliação da concentração inibitória mínima (CIM) do extrato e enxaguatório de *Libidibia ferrea*



### **Microrganismos testes e preparação de inóculos**

Os microrganismos utilizados: *Streptococcus mutans* (ATCC 25175), *Streptococcus salivarius* (ATCC 7073), *Lactobacillus casei* (ATCC 7469) e *Candida albicans* (DPUA 1706).

As cepas bacterianas foram fornecidas pela Fundação Oswaldo Cruz – FIOCRUZ Rio de Janeiro e para o desenvolvimento da pesquisa foram utilizados os equipamentos do laboratório de microbiologia da Faculdade de Odontologia e do Laboratório de Tecnologia Farmacêutica da Faculdade de Ciências Farmacêuticas, ambos da UFAM.

Para obtenção do inóculo os microrganismos foram reativados em caldo ágar nutritivo BHI (Brain Heart Infusion – DIFCO), em tubos de ensaio 10x150mm, incubados a 37°C por 24 horas em aerofilia, para *S. salivarius* e *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 foi realizado o subcultivo da levedura em ágar Sabouraud nas mesmas condições de incubação. Em condições assépticas, foram retiradas alíquotas das bactérias com o auxílio de uma alça de platina esterilizada de 5mm de diâmetro e inoculadas em 5mL de caldo BHI, estéril, em tubos de ensaio 10x150mm. As suspensões foram turbilhoadas em Vórtex até se tornarem homogênea. A padronização do inóculo foi feita através de espectrofotometria de modo a fornecer um padrão de 10<sup>8</sup> UFC/mL para bactérias e 10<sup>6</sup> células / mL para a levedura.

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

A atividade antimicrobiana do extrato e do enxaguatório de *Libidibia ferrea* foi determinada segundo metodologia da Concentração Inibitória Mínima (CIM) em microdiluição proposta por NCCLS (2003), Andrews *et. al.* (2001), adaptação 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, ponteiros 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 100µL. Na placa, as colunas foram distribuídas nos números de 1 a

12 e as linhas nas letras “A” até “H”. Nos poços foram distribuídos o extrato e o enxaguatório de jucá de forma a conter as diferentes concentrações das substâncias testes. 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 (20µL) e complementou-se o volume final com meio.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
<b>MEIO (µL)</b>	20	10	15	20	25	30	35	40	45	50	55	80
<b>SOLUÇÃO(µL)</b>	80	70	65	60	55	50	45	40	35	30	25	0
<b>INÓCULO (µL)</b>	0	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20

Tabela 02 : Valores referentes ao volume em µL da placa de diluição

	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	0,5	0,5	0,43	0,37	0,34	0,31	0,28	0,25	0,21	0,18	0,15
			7	5	3	2	1		8	7	6
E	0,5	0,5	0,43	0,37	0,34	0,31	0,28	0,25	0,21	0,18	0,15
			7	5	3	2	1		8	7	6
F	0,09	0,08	0,07	0,07	0,06	0,06	0,05	0,04	0,04	0,03	0,03
	6	4	8	2	6		4	8	2	6	

Tabela 03: Concentrações finais em mg/mL em cada poço da placa de Eliza, onde A,B e C- Enxaguatório de *L.ferrea*, D e E- Extrato seco diluído (a 6%) e F- clorexidina a 0,12%.

A coluna 01 representará a esterilidade da substância teste, enxaguatório ou extrato + meio sem bactérias. A coluna 12 representará a viabilidade das bactérias, meio + inóculo sem produto teste. A linha F representará o digluconato de clorexidina a 0,12% (controle positivo). Para cada microrganismo será utilizada uma única microplaca, sendo que na mesma placa será testado o enxaguatório de jucá, nas linhas A, B e C, e o extrato de jucá, nas linhas D e E.

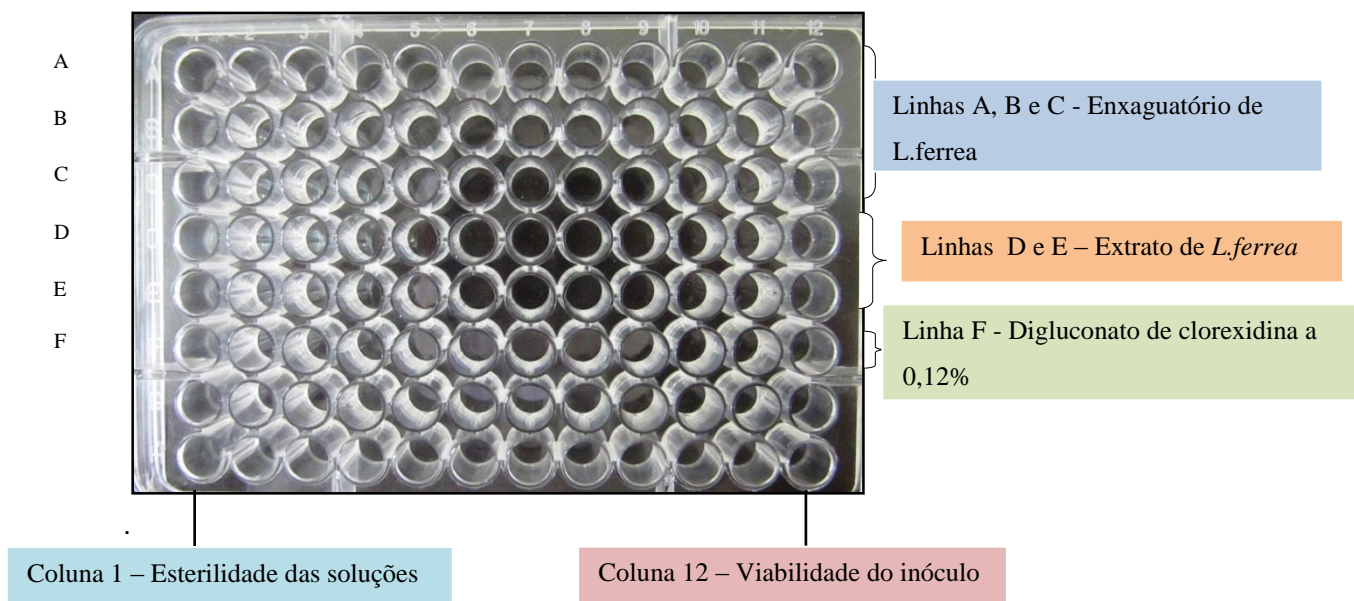


Figura 01: Representação da distribuição em microplaca das substâncias

Após o preenchimento de todos os poços, as microplacas serão seladas com parafilme e incubadas a 37°C por 24 horas, em aerofilia para *C. albicans*, *L. casei* e *S. salivarius* e em microaerofilia o *S. mutans*.

Após o período de incubação, serão incluídas nos poços 30 µL de reagente resazurina preparado em solução aquosa (0,01%, 10 mg diluída em 100 mL). As placas serão novamente incubadas por 30 minutos. A ausência da mudança de cor nos orifícios será interpretada como microrganismo sensível à solução testada.

Para verificação da atividade de concentração inibitória mínima (CIM), quando possível, serão retirados 100µL dos poços referentes ao enxaguatório/extrato de jucá em diferentes concentrações, semeadas em placas de petri com ágar BHI e incubadas a 37°C em aerofilia e microaerofilia, de acordo com o microrganismo testado, durante 24 horas e 48 horas (*S.mutans*) para confirmar a presença de bactérias viáveis.

## 8. Resultados e Discussão

A necessidade de avaliar meios alternativos viáveis economicamente e efetivos no controle do biofilme dental, impulsionou pesquisas de métodos como a Fitoterapia.

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). 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 jucá possui propriedades terapêuticas anti-inflamatória, analgésica e antimicrobiana já comprovadas cientificamente (CAVALHEIRO *et al.*, 2009; PEREIRA *et al.*, 2012; SAMPAIO *et al.*, 2009). Por conta disso, foi centro dos estudos de Conde *et al.* (2016) 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.

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 (OLIVEIRA, 2005).

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 mesma formulação analisada no estudo de Venâncio *et al.* (2015), verificando se suas características se mantiveram estáveis.

A avaliação dos caracteres organolépticos baseou-se na alteração da cor, odor, brilho e consistência. A cor e o brilho foram analisados à luz do dia. A consistência foi avaliada através do toque. O odor da solução 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 2 - Imagem fotográfica representando a avaliação dos caracteres organolépticos.

Foi utilizada uma escala de cores da Coral como referência, onde a cor mais próxima do enxaguatório em estudo foi a cor cerâmica (marrom). Concluiu-se que, a solução apresenta consistência fluida, com aspecto brilhante. Quanto ao odor, apresentou odor forte de aroma de menta.

A avaliação das características organolépticas iniciais realizada por Venâncio *et al.* (2015), indicou que não ocorreram modificações de cor, odor, brilho ou consistência do enxaguatório de *L. ferrea* nos tempos testados, com coloração do enxaguatório marrom escuro, odor agradável e o aspecto homogêneo. O mesmo teste realizado após 24 meses da formulação apresentou as mesmas características. Tal resultado também foi obtido no estudo de Marreiro (2011), analisando uma solução à base da mesma matéria prima vegetal.

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.

Segundo Venâncio *et al.* (2015), no teste de sedimentação não foi observada sedimentação do enxaguatório de *L. ferrea* em nenhum dos três períodos experimentais quando submetidos à centrifugação, tal característica não se manteve estável após 24 meses, apresentando separação de fases. 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.

O valor obtido no teste de pH do enxaguatório de *Libidibia ferrea* após envelhecimento foi de aproximadamente 5.6. Quando comparado com os testes iniciais, feitos por Venâncio *et al.* (2015) que apresentaram valores médios de 6,21, 6,15 e 5,85, nos tempos 0, 30 e 60 dias, respectivamente, observou-se uma redução do pH de acordo com o passar do tempo.



Figura 3 - Tubo facon contendo o enxaguatório de *L.ferrea* após teste de sedimentação.



Figura 4 - Teste de pH do enxaguatório de *L.ferrea*.

Quanto à densidade, no teste realizado após 24 meses, obteve-se a média de 1,029 g/cm<sup>3</sup>, que mostrou-se aceitável quando comparado aos resultados de Venâncio *et al.* (2015), sem apresentar diferenças que interferissem 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 à perda de água ou mesmo pela volatilidade do enxaguatório, como descrito por Isaac *et al.*, 2008.

Quanto à densidade, no teste realizado após 24 meses, obteve-se a média de 1,029 g/cm<sup>3</sup>, que mostrou-se aceitável quando comparado aos resultados de Venâncio *et al.* (2015), sem apresentar diferenças que interferissem 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 à perda de água ou mesmo pela volatilidade do enxaguatório, como descrito por Isaac *et al.*, 2008.

No teste microbiológico empregado não houve indicação de contaminação por bactérias, fungos ou leveduras em nenhum dos tempos testados. Tais resultados corroboram com Venâncio *et al.* (2015) e Marreiro *et al.* (2014a), visto que não houve indicação da presença de microrganismos em nenhum dos estudos, respeitando as padronizações recomendadas pela ANVISA.

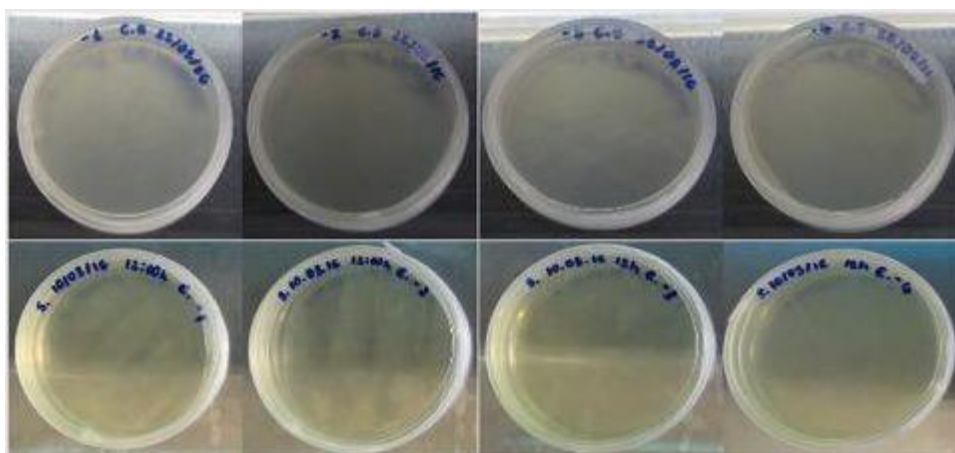


Figura 5 - Avaliação microbiológica para contagem total de microorganismos. Ágar na Caseína Soja e Ágar Sabouraud. importância para a padronização de produtos farmacêuticos, pois cada molécula e tempo pelo qual o fármaco retém sua integridade e pode ser afetado por fatores como temperatura, pH, luminosidade e ar, além do fato da instabilidade poder modificar três pontos primordiais: qualidade, eficácia e segurança.

A avaliação da atividade antimicrobiana do enxaguatório de *L.ferrea* frente a cepas de *S.mutans*, *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 antimicrobiana bactericida/fungicida frente a todos os microrganismos testados em todas as concentrações para os microrganismos *S.mutans* e *C.albicans* e nas concentrações 0,5 mg/ml para o *S.salivarius* e 0,6 mg/ml para *L.casei*. Apresentou atividade bacteriostática na concentração 0,4 mg/mL frente a *L.casei* e *S. salivarius*. Tais resultados quando comparados com os de Venâncio *et al.* (2015), em que o enxaguatório apresentou ação bactericida nas concentrações de 0,55 mg/mL; 0,6 mg/mL e 0,65 mg/mL para o *S. mutans*, *S. oralis* e *S. salivarius* e de 0,25 mg/mL para o *L.casei* e *C.albicans* e ação bacteriostática na concentração de 0,3 mg/mL frente a *S.mutans*, *S.oralis* e *S.salivarius*, comprovam que o

enxaguatório de *L.ferrea* após 30 meses de sua formulação ainda apresenta atividade antimicrobiana contra bactérias presentes no biofilme dental.

Quanto ao extrato de *L.ferrea*, também apresentou ação bactericida em todas as concentrações frente aos microorganismos *S.mutans* e *C.albicans* e nas concentrações 0,312 mg/mL e 0,437 mg/mL para *L.casei* e *S.Salivarius*, respectivamente. O extrato de *L.ferrea* apresentou atividade bacteriostática na concentrações 0,312 mg/mL para *L.casei* e 0,187mg/mL para *S.salivarius*.



Figura 6 - CIM do extrato e enxaguatório de *L.ferrea* frente ao *S.mutans*

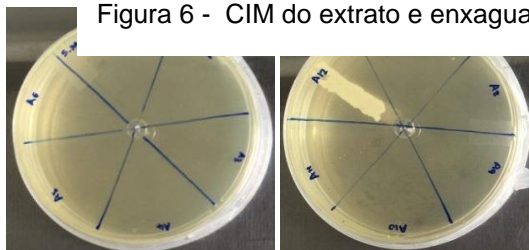


Figura 7- Plaqueamento das linhas A1 a A12 da microdiluição do enxaguatório de *L.ferrea* frente ao *S.mutans*.

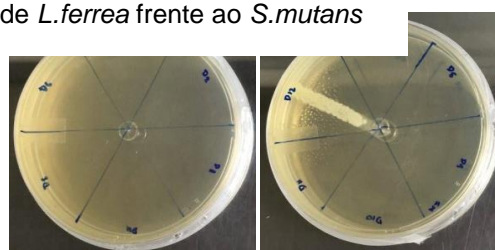


Figura 8- Plaqueamento das linhas D1 a D12 da microdiluição do extrato seco de *L.ferrea* diluído frente ao *S.mutans*.



Figura 9 - CIM do extrato e enxaguatório de *L.ferrea* frente ao *L.casei*

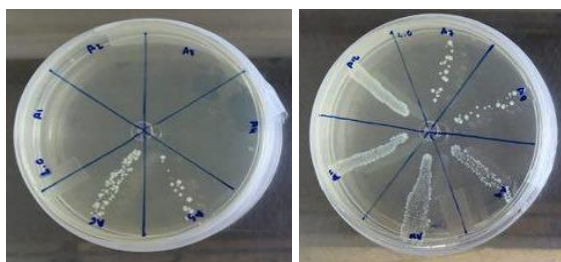


Figura 10- Plaqueamento das linhas A1 a A12 da microdiluição do enxaguatório de *L.ferrea* frente ao *L.casei*.

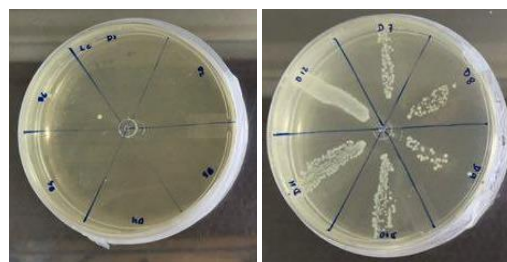


Figura 11- Plaqueamento das linhas D1 a D12 da microdiluição do extrato seco de *L.ferrea* diluído frente ao *L.casei*.

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 microrganismo.

A clorexidina a 0,12% apresentou atividade antimicrobiana bactericida frente a todas as cepas testadas, em todas as concentrações.

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 microrganismo, 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.

## 9. Conclusão

Com base nos resultados pode-se concluir que o enxaguatório e extrato de *L.ferrea* analisado após envelhecimento:

1. Apresentou condições favoráveis de estabilidade, tendo suas características iniciais estáveis, com exceção da homogeneidade e pH da solução.
2. Demonstrou atividade antimicrobiana bactericida e fungicida frente aos microrganismos do biofilme dental.
3. Em todos os períodos experimentais houve ausência de contaminantes.



## 10. Referências

1. AGARWAL, P.; NAGESH, L. Comparative evaluation of efficacy of 0.2% Chlorhexidine, Listerine and Tulsi extract mouth rinses on salivary *Streptococcus mutans* count of high school children - RCT. **Contemp. Clin. Trials**, v.32, n.6, p. 802-8, nov, 2011.
2. ALEXANDRE, R. F.; GARCIA, F. N.; SIMÕES, C. M. O. Fitoterapia Baseada em Evidências. Parte 1. Medicamentos Fitoterápicos Elaborados com Ginkgo, Hipérico, Kava e Valeriana. **Acta Farm. Bonaerense**, v.24, n.2, p. 300-9, 2005.
3. ALVES, E.G., *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.
4. 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.
5. ANDREWS, J.M. Determination of minimum inhibitory concentrations. **J Antimicrob Chemother**, v.48, n.1, p. 5-16, 2001.
6. ARRUDA, A.O.; GALVÃO, M.A.M.; FERREIRA, RANDAU, K.P.; SOARES, L.A.L. Avaliação de parâmetros de qualidade físico-químicos do fruto e casca de *Libidibia ferrea* Martius (jucá). 2014.
7. BENSO, B.; OTUKI, M.F. Atividade anti-inflamatória da *Malva Sylvestris* e perspectivas do uso em Periodontia. **PerioNews**, v.6, n.2, p.154-8, 2012.
8. BORBA, A. N.; MACEDO, M. Plantas medicinais usadas em saúde bucal pela comunidade do bairro Santa Cruz, Chapada dos Guimarães, MT, Brasil. **Acta. Boct. Bras.**, v.20, n.4, p.771-782, 2006.
9. BRANDÃO, M.G.L.; ALVES, R.M.S.; MOREIRA, R.A.; OLIVEIRA, P.; VIEIRA, M.T.; CAMPOS, L.M.M. Qualidade de amostras comerciais de chás de plantas medicinais. **Rev Bras PI Med**, v.5, p. 56-59, 2002.
10. BRASIL 2004. **Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária**, Resolução – RE nº 89, de 16 de março de 2004. Lista de Registro Simplificado de Fitoterápicos. Brasília.
11. BRASIL. **Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Formulário de Fitoterápicos da Farmacopéia Brasileira / Agência Nacional de Vigilância Sanitária**. Brasília: Anvisa, 2011. 126p.
12. BRASIL. **Agência Nacional de Vigilância Sanitária**. Consulta Pública nº 14, de 14 de maio de 2013. Determina a publicação da “Lista de medicamentos fitoterápicos de



UFAM

- registro simplificado” e a “ Lista de produtos tradicionais fitoterápicos de registro simplificado”. Brasília: ANVISA, 2013.
13. BRASIL. Ministério da Saúde. **Agência Nacional de Vigilância Sanitária**. Resolução RE nº 1 de 29 de julho de 2005. Brasília: ANVISA, 2005.
  14. BRITO, I.M.P.A., *et al.* O uso de enxaguatórios bucais no controle da halitose. **Rev. Periodontia**, v.19, n.4, dez, 2009.
  15. BUGNO, A.; NICOLETTI, M.A.; ALMODÓVAR, A.A.B.; PEREIRA, T.C.; AURICCHIO, M.T. Enxaguatórios bucais: avaliação da eficácia antimicrobiana de produtos comercialmente disponíveis. **Rev Inst Adolfo Lutz**, v.65, n.1, p.40-45, 2006.
  16. BUSSADORI, C.M. 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, 2013.
  17. CARRANZA, J.R.; NEWMAN, M.G. **Periodontia clínica**. 11a ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2011.
  18. 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.
  19. CONDE, NIKEILA CHACON DE OLIVEIRA; PEREIRA, MARIA DO SOCORRO VIEIRA; BANDEIRA, MARIA FULGÊNCIA COSTA LIMA ; VENÂNCIO, GISELY NAURA; OLIVEIRA, GLAUBER PALMA DE; SAMPAIO, FÁBIO CORREIA . Atividade antimicrobiana in vitro de plantas da Amazônia sobre alguns micro-organismos formadores do biofilme dental. **Revista Odonto Ciência** (PUCRS. Impresso), v. 30, p. 179, 2016.
  20. CORDEIRO, C.H.G, *et al.* Análise farmacognóstica e atividade antibacteriana de extratos vegetais empregados em formulação para a higiene bucal. **Rev. Bras. Cienc. Farm.** vol.42 no.3 São Paulo July/Sept. 2006
  21. CHOI, D.W.; KIM, J.H.; CHO, S.Y.; HIM, D.H.; CHANG, S.Y. Regulation and quality control of herbal drugs in Korea. **Toxicology**, 181-182: 581-586, 2002.
  22. DECKER, E.M., *et al.* Metabolic activity of *Streptococcus mutans* biofilms and gene expression during exposure to xylitol and sucrose. **Int J Oral Sci**, v.6, p.195-204, jul. 2014.
  23. **FARMACOPÉIA Brasileira**. 5 ed. Vol. 1. Brasília: Agência Nacional de Vigilância Sanitária, 2010.



UFAM

24. **FARMACOPEIA BRASILEIRA**. 4 ed. Parte 1. São Paulo: Atheneu, 1988.
25. FEJESKOV, O.; KIDD E. **Cárie dentária: A doença e seu tratamento clínico**. São Paulo: Santos, 2011.
26. 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.
27. FERREIRA, A.C.R.; QUEIROZ, A.P.G.; PAMPONET, G.P.; COSTA, C.R.; BELIZÁRIO, I.C.; FERREIRA, K.E.; ROCHA, L.R.; PEREIRA, V.F.G.C. Doença Periodontal: Um mal que pode ser evitado. **Brasil J Periodont**, Sept, 2013.
28. FERREIRA, A.O; SOUZA,G.F. **Preparações orais líquidas**. 2ed. São Paulo:Pharmabooks, 2007.
29. FRANCISCO, K.S. Fitoterapia: uma opção para o tratamento odontológico. **Revista Saúde**, v. 4, n. 1, p. 18 - 24, 2010.
30. FREIRES, I.A., *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.**, 2010.
31. 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.
32. GHASEMPOUR, M. *et al.* Frequency, biofilm formation and acid susceptibility of *Streptococcus mutans* and *Streptococcus sobrinus* in saliva of preschool children with different levels of caries activity. **Dent. Res. J.**, v.10, n.4, p.440-5, jul. 2013.
33. GUPTA, D.; BLEAKLEY, B.; GUPTA R.K. Dragon's blood: Botany, chemistry and therapeutic uses. **J Ethnopharmacol**, v.115, p.361-380, 2008.
34. ISAAC, V.L.B.; CEFALI, L.C.; CHIARI, B.G.; OLIVEIRA, C.C.L.G.; SALGADO H.R.N.; CORRÊA, M.A. Protocolo para ensaios físico-químicos de estabilidade de fitocosméticos. **Rev Ciênc Farm Básica Apl**, v. 29, n.1, p. 81-96, 2008.
35. LASCALA, N.T. Promoção de saúde bucal. **1. ed. São Paulo: Editora Artes Médicas Ltda.**, 1997
36. 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.
37. MARREIRO,R.O. *Caesalpinia ferrea*: **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.
38. 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.



UFAM

39. MARREIRO, Raquel de Oliveira. *et al.* Evaluation of the stability and antimicrobial activity of an ethanolic extract of *Libidibia ferrea*. **Clin Cosmet Investig Dent**, v.6, p. 9–13, jan. 2014a.
40. MELO, J.G.; NASCIMENTO, V.T.; AMORIM, E.L.C.; LIMA, C.S.A.; ALBUQUERQUE, U.P. Avaliação da qualidade de amostras comerciais de boldo (*Peumus boldus* Molina), pata de vaca (*Bauhinia* spp) e ginko (*Ginkgo biloba* L). **Rev Bras Farmacogn**, v. 14, P. 111-120, 2004
41. MOREIRA, A.C.A.; SANTOS T.A.M.; CARNEIRO M.C.; PORTO M.R. Atividade de um enxaguatório bucal com clorexidina a 0,12 por cento sobre a microbiota sacarolítica da saliva. **Rev Ciênc Méd Biol.**, v.7, n.3, p.260-72, 2008.
42. 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.
43. OLIVEIRA, M.F.S. Fitoterapia e Biodiversidade no Brasil: saúde, cultura e sustentabilidade. **Revista Ideas Ambientales**, v.1, n.1, abr, 2005.
44. OLIVEIRA, F.Q.; GOBIRA, B; GUIMARÃES, M; BATISTA, J; BARRETO, M; SOUZA, M. Espécies vegetais indicadas na Odontologia. **Rev. Bras Farmacogn**, v. 17, n. 3, p. 466-476, 2007.
45. OLIVEIRA, G.P.; SOUZA, T.P.; CAETANO, S.K.; FARIAS, K.S.; VENANCIO, G.N.; BANDEIRA, M.F.C.L.; CONDE, N.C.O. Atividade antimicrobiana in vitro de extratos da casca do caule e da vagem de *Libidibia ferrea* frente a microrganismos da cavidade bucal. **Revista Fitos**, Rio de Janeiro, v. 8, n.2, p. 73-160, Jul-Dez 2013.
46. PEREIRA L.P, *et al.* Polysaccharide fractions of *Caesalpinia ferrea* pods: Potential anti-inflammatory usage. **J Ethnopharmacol**, v.139, p.642-48, 2012.
47. ROCHA, E.A.L.S.S.; CARVALHO, A.V.O.R.; ANDRADE, S.R.A.; TROVÃO, D.M.M.B.; MEDEIROS, A.C.D.; COSTA, E.M.M.B. Atividade Antimicrobiana 'In vitro' de Extratos Hidroalcoolicos de Plantas Mediciniais do Nordeste Brasileiro em Bactérias do Gênero *Streptococcus*. **Pesq Bras Odontoped Clin Integr**, JoãoPessoa, jul/set, 2013.
48. ROJAS, F.J.E.; SANTOS-ALEMANY, A. Colutorios para el control de placa y gingivitis basado sen la evidencia científica. **Rev ilutre Cons Gen Col Odontól Estomatól**, v.10, n.4, p.445-52, 2005.
49. SAMPAIO, F.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.
50. SCANNAPIECO, F.A. Inflamação periodontal: da gengivite à doença sistêmica? **Compendium**, v.25, n.7, p.16-25, 2004.





# UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS

## RELATÓRIO FINAL PIBIC/PAIC 2015-2016



--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--

R: Atividades realizadas  
P: Atividades previstas