



UNESP – Universidade Estadual Paulista
“Júlio de Mesquita filho”
Faculdade de Odontologia de Araraquara



YASMIN ETIENNE ALBUQUERQUE

Validação de um modelo de indução de cárie in vitro e avaliação de um enxaguatório bucal contendo óleo essencial de *Croton doctoris* S. Moore na desmineralização do esmalte e na composição do biofilme polimicrobiano

Araraquara
2015



UNESP – Universidade Estadual Paulista
“Júlio de Mesquita Filho”
Faculdade de Odontologia de Araraquara



YASMIN ETIENNE ALBUQUERQUE

Validação de um modelo de indução de cárie in vitro e avaliação de um enxaguatório bucal contendo óleo essencial de *Croton doctoris* S. Moore na desmineralização do esmalte e na composição do biofilme polimicrobiano

Dissertação apresentada ao programa de Pós-Graduação em Ciências Odontológicas, área de Odontopediatria, da Faculdade de Odontologia de Araraquara, da Universidade Estadual Paulista, para obtenção do título de Mestre em Ciências Odontológicas.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Fernanda Lourenção Brighenti

Araraquara
2015

Albuquerque, Yasmin Etienne

Validação de um modelo de indução de cárie in vitro e avaliação de um enxaguatório bucal contendo óleo essencial de *Croton doctoris* S. Moore na desmineralização do esmalte e na composição do biofilme polimicrobiano / Yasmin Etienne Albuquerque. -- Araraquara: [s.n.], 2015.

92 f. ; 30 cm.

Dissertação (Mestrado) – Universidade Estadual Paulista,
Faculdade de Odontologia

Orientadora: Profa. Dra. Fernanda Lourenção Brighenti

1. Óleo de *Croton* 2. Produtos com ação antimicrobiana 3. Placa dentária 4. Desmineralização I. Título

YASMIN ETIENNE ALBUQUERQUE

Validação de um modelo de indução de cárie in vitro e avaliação de um enxaguatório bucal contendo óleo essencial de *Croton doctoris* S. Moore na desmineralização do esmalte e na composição do biofilme polimicrobiano

COMISSÃO JULGADORA

DISSERTAÇÃO PARA OBTENÇÃO DO GRAU DE MESTRE

Presidente e Orientadora: Profa. Dra. Fernanda Lourenção Brighenti

2º Examinador: Profa. Dra. Elisa Maria Aparecida Giro

3º Examinador: Profa. Dra. Aline Raquel Voltan

Araraquara, 12 de março de 2015.

YASMIN ETIENNE ALBUQUERQUE

DADOS CURRICULARES

Nascimento: 05/09/1989 – São Carlos – SP

Filiação: Aldir José Gonçalves Albuquerque e Sonia Romão de Carvalho
Albuquerque

FORMAÇÃO ACADÊMICA

2008 - 2012: Curso de Graduação - Faculdade de Odontologia de Araraquara
Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”

2013 - 2015: Curso de Pós-Graduação em Ciências Odontológicas, Área de
Concentração em Odontopediatria – Curso de Mestrado, - Faculdade de
Odontologia de Araraquara Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”.

ASSOCIAÇÕES

Sociedade Brasileira de Pesquisa em Odontologia - SBPqO

Dedico este trabalho...

*A toda a minha família e àqueles que acreditaram
em mim.*

Agradecimentos especiais

A Mayra Delbon, técnica do laboratório de Pesquisa Bioquímica e Microbiológica da FOAr, por todo o auxílio e amizade.

A Marcelle Danelon, Pós-Doutoranda da Faculdade de Odontologia de Araçatuba – UNESP, pela disposição em me orientar e ajudar em parte do meu projeto.

A Analú Oliveira, graduanda da FOAr, pela indispensável contribuição nesse trabalho e pelos momentos de descontração.

Agradecimentos

Primeiramente a Deus, por ter me dado forças para continuar em frente durante os momentos de tormenta.

A minha mãe Sonia e as minhas irmãs Yanick e Yulli, pelo apoio e torcida na concretização desse trabalho.

A minha Orientadora, Profa. Dra. Fernanda Lourenção Brighenti, pela confiança, paciência e contribuição na minha formação profissional.

Aos meus queridos amigos Pamella, Lana, Daniel, Eliana, Renata, Patrícia e Marina. A amizade de vocês não tem preço.

As alunas e alunos de Mestrado, Doutorado e Iniciação Científica: Vinícius, Cláudia, Natália, Carol Mendes, Rosa, Luana, Diego, Manuel, Camila, Carol Becci, Gláucia, Analú, Aline e Ana Luíza. Admiro todos vocês.

Aos docentes da Disciplina de Odontopediatria da Faculdade de Odontologia de Araraquara, UNESP, Profa. Dra. Elisa Maria Aparecida Giro, Profa. Dra. Rita Loiola Cordeiro, Profa. Dra. Josimeri Hebling Costa, Profa. Dra. Lourdes Aparecida Martins dos Santos Pinto, Profa. Dra. Ângela Cristina Cilense Zuanon, Prof. Dr. Cyneu Aguiar Pansani e Prof. Dr. Fabiano Jeremias.

Aos professores colaboradores deste trabalho, Prof. Dr. Marcos José Salvador, Prof. Dr. Alberto Carlos Botazzo Delbem, Profa. Dra. Ádina Cléia Botazzo Delbem, Profa. Dra. Marcelle Danelon e Profa. Dra. Cristiane Yumi Koga-Ito.

À Faculdade de Odontologia de Araraquara, na pessoa das professoras Profa. Dr^a Andreia Montandon, digníssima Diretora e Profa. Dra. Elaine, digníssima Vice-Diretora.

Ao Curso de Pós-Graduação em Ciência Odontológica da Faculdade de Odontologia de Araraquara-UNESP, na pessoa do coordenador Prof. Dr. Osmir Batista de Oliveira Júnior.

Aos funcionários da biblioteca da Faculdade de Odontologia de Araraquara da UNESP, pela atenção, ajuda e disponibilidade com que me atendem sempre.

Aos funcionários da Seção de Pós-Graduação da Faculdade de Odontologia de Araraquara-UNESP, pelo profissionalismo e atenção.

A todos os funcionários da FOAr, por todo o suporte técnico e atenção carinhosa.

À FAPESP (2013/12547-4) e a CNPq (444195/2014-9), pela concessão de

recursos que possibilitaram a realização deste Curso de Mestrado.

E a todos aqueles que, de alguma forma, contribuíram para a
realização deste projeto, minha eterna gratidão.

“...Sempre haverá uma outra montanha
Eu sempre vou querer movê-la
Sempre será uma batalha difícil
Às vezes eu vou ter que perder
Não é sobre o quão rápido chegarei lá
Não é sobre o que está me esperando do outro lado
É a escalada...”

The Climb – Jessi Alexander e Jon Mabe

Albuquerque YE. Validação de um modelo de indução de cárie in vitro e avaliação de um enxaguatório bucal contendo óleo essencial de *Croton doctoris* S. Moore na desmineralização do esmalte e na composição do biofilme polimicrobiano [Dissertação de Mestrado]. Araraquara: Faculdade de Odontologia da UNESP; 2015.

Resumo

O objetivo deste trabalho foi validar um modelo de indução de cárie in vitro e utilizá-lo para avaliar a atividade antimicrobiana de um enxaguatório bucal contendo óleo essencial de *Croton doctoris*. Foram realizados estudos com biofilme polimicrobiano desenvolvido na superfície de blocos de esmalte de dentes bovinos. Os blocos foram submetidos a um regime semi-contínuo de exposição à sacarose, no qual as variáveis estabelecidas foram avaliadas de acordo com os resultados de concentração bacteriana nos biofilmes formados, com a acidogenicidade do biofilme e percentual de perda de dureza do esmalte. O óleo essencial foi obtido através da hidrodestilação e suas concentrações inibitória mínima (CIM) e bactericida mínima (CBM) foram determinadas através da técnica de microdiluição em caldo. O enxaguatório bucal contendo óleo essencial em concentração equivalente a CIM foi empregado no modelo desenvolvido. Um enxaguatório bucal sem óleo essencial e digluconato de clorexidina 0,12% (CHX) foram utilizados, respectivamente, como controle negativo e positivo. Ficou estabelecido um regime cariogênico com 0,5% de sacarose e exposição às soluções de tratamento por quatro dias. As CIM/CBM do óleo essencial e CHX foram, respectivamente, 0,625%/1,250% and 0,004%/0,008%. A ação do enxaguatório bucal com óleo essencial foi estatisticamente semelhante ao controle negativo em todas as avaliações ($p > 0,05$), ao contrário da CHX ($p < 0,001$). Conclui-se, através do modelo validado, que o óleo essencial de *C. doctoris*, quando incorporado em enxaguatório em concentração equivalente à CIM, não é eficaz no

controle do crescimento de biofilmes polimicrobianos e da desmineralização do esmalte dentário.

Palavras-chave: Óleo de *Croton*, rodutos com ação antimicrobiana, placa dentária, desmineralização.

Albuquerque YE. Validation of an in vitro caries induction model and evaluation of a mouthrinse containing *Croton doctoris* S. Moore essential oil on enamel demineralization and polymicrobial biofilm composition [Dissertação de Mestrado]. Araraquara: Faculdade de Odontologia da UNESP; 2015.

Abstract

The aim of this work was to validate an in vitro caries induction model and use it to evaluate the antimicrobial activity of a mouthrinse containing *Croton doctoris* essential oil. Studies were performed with polymicrobial biofilm developed on the surface of enamel bovine blocks. The blocks were subjected to a semi-continuous regimen of sucrose exposure, in which different variables were evaluated. The following parameters were studied: biofilm bacterial concentration and acidogenicity and percentage of enamel hardness loss. The essential oil was obtained by hydrodistillation and its minimum inhibitory concentration (MIC) and minimum bactericidal concentration (MBC) were determined by broth microdilution. The developed model was applied to test a mouthwash containing essential oil at CIM concentration. A mouthwash without essential oil and chlorhexidine digluconate 0.12% (CHX) were used, respectively, as negative and positive control. It was established a cariogenic regimen with 0.5% sucrose and exposure to the treatment solutions for four days. The MIC/MBC of the essential oil and CHX were, respectively, 0.625%/1.250% and 0.004%/0.008%. There were no significant statistically difference between the mouthwash with essential oil action and the negative control in all parameters evaluated ($p > 0.05$). CHX showed significant differences from control ($p < 0.001$). Using the validated model, it can be concluded that the incorporation of *C. doctoris* essential oil to a mouthwash at CIM, is not effective in controlling polymicrobial biofilms growth and enamel desmineralization.

Keywords: *Croton* oil, products with antimicrobial action, dental plaque, demineralization

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO	16
CAPÍTULO 1	21
CAPÍTULO 2	49
CONCLUSÃO	75
REFERÊNCIAS	76
APÊNDICES	82
ANEXOS	87

INTRODUÇÃO

A cárie dentária é uma doença multifatorial, de origem infecciosa, resultante de um desequilíbrio entre os processos de desmineralização e remineralização, decorrente da interação de fatores determinantes (hospedeiro, microbiota cariogênica, dieta rica em carboidratos e tempo) (Keyes¹², 1960; Newbrum²¹, 1988) e pela presença de fatores modificadores (fatores sociais, econômicos e comportamentais) (Manji, Ferjeskov¹⁴, 1990).

Os estudos sobre o desenvolvimento da cárie dentária se iniciaram após a comprovação do envolvimento de micro-organismos, quando foi observado que a administração de penicilina em ratos poderia prevenir o aparecimento de lesões de cárie, mesmo na presença de uma dieta cariogênica (McClure, Hewitt¹⁷, 1946) e quando ratos “livres de germes” submetidos a uma dieta cariogênica por um período de tempo, não desenvolveram lesões cariosas (Orland et al.²², 1954).

Em 1980, foi proposto que os ácidos produzidos pelos micro-organismos presentes na cavidade oral, através da fermentação dos carboidratos, seriam os responsáveis pelo aparecimento de lesões cariosas, dando origem à Teoria Acidogênica ou Químico-Parasitária (Miller¹⁹, 1980). Desde então, diversas outras teorias foram propostas para explicar a etiologia da cárie dentária.

Marsh¹⁶, em 1994, propôs a Teoria da Placa Ecológica, na qual o fornecimento constante de carboidratos estabelece um ambiente ácido e favorece o crescimento de bactérias que se adaptam bem a esse tipo de ambiente, ocasionando o desenvolvimento de lesões de cárie.

Em 2008, Takahashi, Nyvad³² propuseram uma extensão a essa teoria, explicando de forma específica a relação entre a composição da placa dentária e o processo do desenvolvimento de lesão de cárie. Esses autores propuseram que o desenvolvimento da cárie se dá em três fases. Na fase de estabilidade dinâmica, micro-organismos não mutans e *Actinomyces spp.* mantêm o pH do biofilme estável, pois os ácidos produzidos por essas bactérias são facilmente neutralizados. Contudo, quando açúcares são fornecidos com frequência, essas bactérias alteram sua acidogenicidade e aciduricidade de forma adaptativa, estabelecendo um ambiente ácido (fase acidogênica), ocasionando a perda mineral. A prevalência do ambiente ácido ocasionará a proliferação de bactérias acidúricas que por sua vez ajudarão a manter o ambiente ácido e aumentarão a perda mineral, acelerando então o desenvolvimento de lesões de cárie (fase acidúrica) (Takahashi, Nyvad³², 2008).

O biofilme dental é composto por micro-organismos envolvidos em uma matriz rica em polissacarídeos extracelulares sobre uma camada de proteína denominada película adquirida, que é constituída por glicoproteínas salivares, fosfoproteínas, lipídeos e componentes do fluído gengival. Os micro-organismos, atraídos por nutrientes orgânicos acumulados, se aderem a essa película através de adesinas presentes na superfície celular bacteriana e criam um ambiente atrativo para a colonização subsequente de outros micro-organismos. Em consequência, polissacarídeos são produzidos e depositados na superfície dentária contribuindo para a formação da matriz e maturação do biofilme (Ferjeskov, Kidd¹⁰, 2008).

A presença do biofilme dentário é considerada o principal fator etiológico local da cárie dentária (Zanela et al.⁴⁰, 2002). Apesar de seu controle mecânico ser considerado a primeira medida a ser tomada (Cury⁶, 1997), essa medida é pouco

eficaz, pois remove apenas 42% do biofilme presente (Slot et al.³⁰, 2012). O uso de fluoretos como adjuvante no controle da cárie dentária tem se mostrado eficaz. Porém, ele não é capaz de controlá-la completamente (ten Cate³³, 2009). Portanto, destaca-se a necessidade do uso de substâncias antimicrobianas com potencial para auxiliar na prevenção da cárie dentária.

Entre os produtos antimicrobianos disponíveis no mercado, encontra-se a clorexidina, que apresenta um amplo espectro de ação, atividade bactericida em concentrações mais elevadas e atividade bacteriostática em concentrações mais baixas (Torres³⁵, 2000). Apesar de ser comprovadamente eficaz no controle da microbiota salivar (Roldan et al.²⁷, 2004; Ribeiro et al.²⁵, 2007), possui ação diminuída contra biofilmes maduros (Vitkov et al.³⁴, 2005; Zanata et al.³⁹, 2007). Ainda, quando utilizada por períodos prolongados causa manchamento dos dentes, descamação reversível da mucosa, alterações do paladar e aumento dos calcificados supragengivais (Torres³⁵, 2000). Alguns autores relataram que essa substância possui efeito citotóxico e pode induzir a ocorrência de danos genéticos (Hidalgo, Dominguez¹¹, 2001; Faria et al.⁹, 2009, Carlin et al.³, 2012).

O cloreto de cetilpiridínio é uma substância tenso-ativa catiônica que possui atividade antimicrobiana contra um amplo espectro de bactérias (Pitten, Kramer²⁴, 2001) e demonstrou eficácia no controle da formação do biofilme dentário (Mankod et al.¹⁵, 2005; Costa et al.⁵, 2013; Van Leeuwen et al.³⁷, 2014). Porém, o seu efeito terapêutico na cavidade bucal é de apenas 90 min (Roberts, Add²⁶, 1981) e em altas concentrações pode causar efeitos colaterais como manchas, ulcerações, coloração da língua e dos dentes, sensação de ardência e alteração do paladar (Alves et al.¹, 2012).

O triclosan é um composto bisfenólico não iônico que possui propriedades antibacterianas e anti-inflamatórias (Paraskevas²³, 2005) e não causa efeitos colaterais. Contudo, seu potencial de ação é mais eficaz quando associado a outros agentes, devido a sua baixa substantividade (Schaecken et al.²⁸, 1996; Eley⁸, 1999; Boneta et al.², 2010).

Todas essas substâncias podem ser encontradas em formulações de enxaguatórios bucais disponíveis no mercado, no qual grande parte possui álcool em sua composição. O álcool é utilizado para solubilizar e estabilizar os princípios ativos, evitar a contaminação do produto e para aumentar o prazo de validade. Contudo, é contra-indicado para grávidas, lactantes, diabéticos, pacientes imunossuprimidos ou com mucosite (Van Strydonck et al.³⁶, 2005), pode causar desgaste das restaurações de resina presentes nos dentes (White³⁸, 2005) e aumentar o risco de desenvolvimento de câncer bucal (Lachenmeier¹³, 2008; McCullough, Farah¹⁸, 2008). Portanto, há a necessidade de ser desenvolver produtos efetivos que não contenham álcool em sua formulação.

Uma vez que plantas medicinais produzem uma variedade de substâncias com propriedades antimicrobianas, é esperado que várias áreas da saúde desenvolvam pesquisas com o objetivo de identificar essas substâncias para o desenvolvimento de novos produtos (Ministério da Saúde²⁰, 2006). Desde 1978, a Organização Mundial de Saúde (OMS) tem relatado a importância do uso de plantas medicinais como recurso terapêutico e tem recomendado a difusão mundial dos conhecimentos necessários para o seu uso. Apesar do Brasil apresentar uma grande biodiversidade de plantas, seu potencial para o desenvolvimento de Fitoterápicos só foi reconhecido pelo Governo Federal em 2006, por meio da criação da “Política Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterapia” (Decreto Federal nº 5.813,

de 22 de junho de 2006⁷). Essa política tem o objetivo de fomentar pesquisas, desenvolvimento tecnológico e inovação na área de produtos naturais e atender as necessidades epidemiológicas do país (Ministério da Saúde²⁰, 2006). Esse Decreto resultou na criação, em 2009, da Relação Nacional de Plantas Medicinais de Interesse ao SUS (Rennisus), que apresenta uma lista de 71 plantas com potencial para gerar produtos de interesse para a rede pública de saúde. Apesar da criação dessas políticas, na área odontológica, os estudos têm se demonstrado escassos no país (Castro et al.⁴, 2014).

Diversos estudos *in vitro* foram realizados para testar a atividade antimicrobiana de substâncias experimentais. Porém, muitos deles utilizaram modelos que não refletem a situação *in vivo* em cavidades orais (Tabenski et al.³¹, 2014). Sissons, em 1997, propôs um modelo que utiliza biofilmes polimicrobianos provenientes da microbiota natural para mimetizar *in vitro* o biofilme formado *in vivo*. Esse modelo por manter a maior parte da complexidade e da heterogeneidade do biofilme dentário é útil para avaliar o potencial de agentes antimicrobianos para gerar novos produtos (Sissons²⁹, 1997).

As plantas listadas na Rennisus precisam ser investigadas quanto ao seu potencial antimicrobiano. Para isso, é necessário estar disponível um modelo validado de indução de cárie *in vitro* que utiliza biofilmes polimicrobianos para que os estudos possam ser realizados. Plantas do gênero *Croton* estão inclusas nesta lista. Portanto, o objetivo desse trabalho é validar um modelo experimental de indução de cárie *in vitro* (Capítulo 1) e utilizá-lo para a avaliação *in vitro* de um enxaguatório bucal contendo óleo essencial de *Croton doctoris* S. Moore quanto a sua capacidade de impedir a desmineralização do esmalte e de interferir na composição do biofilme polimicrobiano (Capítulo 2).

CAPÍTULO 1

Validação de um modelo experimental de indução de cárie para testes de formulações farmacêuticas com atividade antimicrobiana*

Albuquerque YE¹, Danelon M², Delbem ACB², Delbem ACB², Salvador MJ³, Koga-Ito CY⁴, Brighenti FL¹.

¹UNESP – Faculdade de Odontologia de Araraquara, Departamento de Clínica Infantil, Araraquara – SP, Brasil.

²UNESP – Faculdade de Odontologia de Araçatuba, Departamento de Odontologia Infantil e Social, Araçatuba – SP, Brasil.

³UNICAMP – Instituto de Biologia, Departamento de Biologia Vegetal – Campinas – SP, Brasil.

⁴UNESP – Instituto de Ciência e Tecnologia, Departamento de Engenharia Ambiental - São José dos Campos – SP, Brasil.

Autor correspondente:

Fernanda Lourenção Brighenti

Rua Humaitá, 1680 – Centro

Araraquara – SP

CEP: 14801 – 903

Tel: +55 (16) 33016551

E-mail: fbrighenti@foar.unesp.br

***De acordo com o manual da FOAr/UNESP, adaptadas das normas Vancouver. Disponível no site: <http://www.foar.unesp.br/#!/biblioteca/manual>**

Resumo

A elaboração e validação de modelos simples de indução de cárie in vitro são úteis na avaliação de novos agentes antimicrobianos. O objetivo deste trabalho foi validar um modelo experimental de indução de cárie in vitro para realizar testes de atividade antimicrobiana de formulações farmacêuticas. Foram realizados seis estudos, no qual biofilmes polimicrobianos se desenvolveram na superfície de blocos de esmalte de dentes bovinos. Os blocos foram submetidos a um regime semi-contínuo de exposição à sacarose. Foram avaliadas as seguintes variáveis: concentração de sacarose no meio de cultura, manutenção ou retirada da saliva após inoculação inicial, duração do experimento, uso de solução neutralizadora e quantidade de exposições às soluções de tratamento. As variáveis foram avaliadas de acordo com os resultados de concentração bacteriana nos biofilmes formados, de acidogenicidade do biofilme e de percentual de perda de dureza do esmalte (%SH). Nos estudos 1 e 2, o crescimento do biofilme foi, respectivamente, deficiente ou exagerado. O estudo 3 demonstrou uma %SH ideal e serviu de base para os estudos seguintes. Nos estudos 4 e 5 não observou-se diferenças entre os tratamentos na %SH. O modelo estabelecido no Estudo 6 demonstrou resultados satisfatórios com o uso de 0,5% de sacarose, com a manutenção da saliva após a inoculação inicial e com a realização de dois tratamentos diários iniciados após o crescimento do biofilme, sem o uso da solução neutralizadora e com a duração do experimento de quatro dias. Considera-se que o modelo foi validado para o teste de atividade antimicrobiana de formulações farmacêuticas.

Palavras-chave: placa dentária, desmineralização, microbiota, cárie dentária.

Introdução

Pesquisas utilizando biofilmes formados naturalmente *in vivo* são difíceis de serem realizadas devido à presença de uma série de variáveis que não são possíveis de serem controladas, pela complexidade do ambiente oral ou por razões éticas (McBain²⁰, 2009). Dessa maneira, modelos experimentais para a formação de cárie *in vitro* e *in situ* foram desenvolvidos para que os resultados obtidos possam ser comparáveis à realidade dos processos que ocorrem naturalmente *in vivo* (Zero et al.³⁹, 1992; Vieira et al.³², 2005; van de Sande et al.³⁰, 2011; Afonso et al.¹, 2013).

Dentre os modelos experimentais *in vitro*, os de ciclagem de pH têm sido utilizados para testar a eficácia de produtos fluoretados (Argenta et al.², 2003; Vieira et al.³², 2005, Queiroz et al.²³, 2008; Rodrigues et al.²⁴, 2008). Nesses modelos, substratos dentários são expostos a ciclos de soluções ácidas e neutras com o objetivo de simular a dinâmica de perda e ganho de mineral envolvido na formação de lesões de cárie (White³⁴, 1995; ten Cate, Mundorff-Shrestha²⁸, 1995). Porém, esses modelos são limitados, pois não incluem a participação de micro-organismos no processo de indução de cárie.

Modelos experimentais que envolvam a participação de micro-organismos no desenvolvimento das lesões são indispensáveis para o teste de produtos com atividade antimicrobiana. Dentre eles, o utilizado com maior frequência é o modelo de indução de cárie *in situ*. Nesse modelo, o substrato dentário é exposto a uma alta concentração de sacarose com grande frequência diária e o biofilme se desenvolve a partir da microbiota bucal natural do voluntário (Cury et al.¹⁰, 2010; Brighenti et al.⁸, 2012). Porém, o número de voluntários envolvidos nos estudos é limitado devido à natureza do estudo, que demanda um longo tempo de execução e necessita de

grande cooperação e atenção dos voluntários para a utilização dos dispositivos orais (Zero³⁸, 1995; Tenuta et al.²⁹, 2006).

Modelos *in vitro* que utilizam micro-organismos para o desenvolvimento de lesões de cárie podem envolver a participação de um único micro-organismo (Dummer et al.¹¹, 1982; Gilmour, Edmunds¹⁴, 1990; Hsu et al.¹⁷, 1998) ou de um conjunto de várias espécies (Bowden⁷, 1999; Shu et al.²⁶, 2000, Arthur et al.⁴, 2013). Alguns utilizam dentes humanos como substratos (Dummer et al.¹¹, 1982; Hsu et al.¹⁷, 1998; Arnold et al.³, 2001), e outros utilizam dentes bovinos (Hayati et al.¹⁶, 2011; Arthur et al.⁴, 2013). O tempo de desafio cariogênico varia de acordo com o objetivo do estudo e com o substrato utilizado, podendo chegar até 28 dias (Arnold et al.³, 2001).

Considerando que o uso de micro-organismos isolados ou em associação não reflete a realidade biológica do ambiente oral (Marsh¹⁹, 1995), Sissons²⁷, 1997, propôs o uso de um biofilme polimicrobiano *in vitro* proveniente da microbiota natural para mimetizar o biofilme formado *in vivo*. Esse modelo mantém a maior parte da complexidade e da heterogeneidade do biofilme dentário e é útil para realizar a triagem de agentes antimicrobianos.

Mais recentemente, foi proposto o crescimento de biofilmes polimicrobianos utilizando blocos de esmalte bovinos e um regime semi-contínuo de exposição à sacarose para o teste de substâncias antimicrobianas (van de Sande et al.³⁰, 2011). Porém, esse modelo utiliza o meio de cultura DMM (Wong, Sissons³⁶, 2001), que é muito complexo, de alto custo e até o momento não foi validado por outros estudos.

O meio de cultura proposto por McBain é simples, de custo mais baixo e amplamente utilizado para o crescimento de biofilme polimicrobiano (McBain et al.²¹,

2005; Pham et al.²², 2009; Cheng et al.⁹, 2011; Zhang et al.⁴⁰, 2013). O objetivo deste trabalho foi validar um modelo experimental de indução de cárie in vitro, utilizando um meio de cultura acessível para a realização de testes de atividade antimicrobiana de formulações farmacêuticas.

Materiais e método

As aprovações éticas foram concedidas pelo Comitê de Ética em Pesquisa em Seres Humanos (CEP) (Parecer de Aprovação 405.841) (Anexo 1) e pela Comissão de Ética no Uso de Animal (CEUA) (Parecer de Aprovação 28/2013) (Anexo 2) da Faculdade de Odontologia de Araraquara – UNESP.

Preparo dos blocos de esmalte e teste de microdureza

Foram utilizados incisivos centrais inferiores permanentes obtidos de bovinos com idade entre 2 e 3 anos e mantidos previamente em formol a 2% pH 7,0 durante 30 dias. Blocos de esmalte bovino (4 x 4 mm) foram preparados a partir da porção mais plana da superfície vestibular das coroas utilizando cortadeira elétrica (Buehler, Lake Bluff, USA and Mitutoyo Corporation, Kanagawa, Japan). Após a obtenção dos blocos de esmalte, a dentina foi planificada e o esmalte foi polido com o uso de uma politriz (Buehler, Lake Bluff, IL, USA), lixas de granulação 320, 600, 800 e 1200 (20 s cada) e feltro com solução diamantada 1 µm por 2 min (Apêndice A1).

Os blocos foram submetidos ao teste de microdureza inicial (SH1), utilizando microdurômetro Micromet 5114 hardness tester (Buehler, Lake Bluff, IL, EUA), com penetrador tipo Knoop, carga estática de 25 g e tempo de 10 s, acoplado ao software para análise de imagem Buehler OmniMet (Buehler, Lake Bluff, EUA)

(Vieira et al.³², 2005). Foram realizadas cinco impressões na região central do bloco de esmalte, com espaço de 100 µm entre elas (Apêndice A2). Os blocos que apresentaram SH1 entre 320-380 KHN foram distribuídos em grupos estatisticamente homogêneos, de acordo com a SH1 da população total de blocos e seu intervalo de confiança ($\alpha < 0,05$).

Após o término de cada estudo, foi realizado um novo teste de dureza de superfície (SH2), de acordo com a metodologia já descrita anteriormente. A porcentagem de perda de dureza de superfície (%SH) foi calculada de acordo com a seguinte fórmula: $\%SH = 100 \times (SH2 - SH1) / SH1$.

Coleta de saliva

Para cada Estudo, saliva fresca foi coletada de um voluntário saudável em jejum, que permaneceu por 24 horas sem escovar os dentes e que não utilizou antibióticos ou antifúngicos nos últimos seis meses (van de Sande et al.³⁰, 2011). A saliva foi coletada na manhã do experimento e uma alíquota da mesma foi processada para determinação da composição microbiana inicial. A saliva coletada e suas respectivas diluições foram mantidas em temperatura ambiente nos Estudos 1 e 2, e em um recipiente com gelo nos Estudos 3, 4 5 e 6. Foi quantificada a concentração de bactérias anaeróbias totais em ágar BHI (Brighenti et al.⁸, 2012), de estreptococos do grupo mutans em ágar Mitis Salivarius suplementado com 20% de sacarose e 0,2 UI/mL bacitracina (MSBS) (Gold et al.¹⁵, 1973), de lactobacilos em ágar Rogosa (Rogosa et al.²⁵, 1951) e bactérias anaeróbias acidúricas em ágar BHI com pH 4,7 (Azevedo et al.⁶, 2014). As placas de ágar BHI foram incubadas em anaerobiose (Anaerobac - Probac do Brasil Produtos Bacteriológicos Ltda, Santa Cecília, SP, Brasil) a 37 °C por 48 h, as de ágar MSBS e ágar Rogosa foram

incubadas em microaerofilia a 37 °C por 48 h e as placas de ágar BHI com pH 4,7 em anaerobiose a 37 °C por 96 h. O número de Unidades Formadoras de Colônias (UFC) foi obtido com o auxílio de contador de colônias (Phoenix, Lufenco CP 600 Plus, Araraquara – SP, Brasil). Os resultados foram expressos em log (1+ UFC/mL).

Condições de crescimento e tratamento do biofilme polimicrobiano

Para crescimento do biofilme polimicrobiano, foi utilizado o meio de McBain suplementado com diferentes concentrações de sacarose. Esse meio é composto por mucina gástrica suína (2,5 g/L), peptona bacteriológica (2,0 g/L), triptona (2,0 g/L), extrato de levedura (1,0 g/L) NaCl, (0,35 g/L), KCl (0,2 g/L), CaCl₂ (0,2 g/L), cloridrato de cisteína (0,1 g/L), hemina, (0,001 g/L) e vitamina K1 (0,0002 g/L), pH 7,0 (McBain et al.²¹, 2005).

Foram realizados, no total, seis estudos para a validação do modelo experimental, nos quais as seguintes variáveis foram analisadas: concentração de sacarose no meio de cultura, manutenção ou retirada da saliva após inoculação inicial, duração do experimento, uso de solução neutralizadora e quantidade de exposições às soluções de tratamento.

Estudo 1

Os biofilmes cresceram nos blocos de esmalte (n=5) utilizando o modelo recentemente desenvolvido por van de Sande et al.³⁰ (2011), com a substituição do meio de cultura DMM para o meio McBain, conforme descrito anteriormente. O regime de exposição à sacarose foi semi-contínuo, no qual o biofilme foi exposto a 1% de sacarose durante 6 h diárias, alternando com períodos em que os blocos de esmalte permaneceram no meio de cultura sem sacarose por 18 h.

Os blocos foram posicionados verticalmente para criar um modelo de adesão ativa (Exterkate et al.¹³, 2010) e esterilizados em micro-ondas (Viana et al.³¹, 2009), utilizando a potência de 410 W (Apêndice A3).

Para simular o tratamento com as formulações farmacêuticas, os blocos foram imersos por 1 min em 2 mL de água destilada esterilizada e lavados por imersão em solução salina 0,9%, antes e após a simulação do tratamento. O experimento foi realizado por cinco dias, cujos tratamentos foram realizados do 2º ao 4º dia de crescimento do biofilme, antes dos blocos serem imersos no meio de cultura contendo sacarose.

Estudo 2

O procedimento foi realizado conforme descrito no Estudo 1 com 5 blocos de esmalte, porém a cultura semi-contínua foi realizada com meio McBain suplementado com 2% de sacarose por 6 h e meio McBain suplementado com 1% de sacarose por 18 h.

Estudo 3

O procedimento foi realizado conforme descrito no Estudo 1 com três blocos de esmalte, utilizando a saliva de outro doador, que foi mantida em gelo durante a coleta e não foi aspirada após o período de incubação.

Estudo 4

O procedimento foi realizado de acordo com o Estudo 3, utilizando três blocos de esmalte por grupo, de acordo com o tipo de tratamento: a) Tratamento com 1,8

mL de enxaguatório bucal experimental, sem a adição de princípio ativo (controle negativo) e b) tratamento com 1,8 mL de digluconato de clorexidina 0,12% (“CHX”, Periogard®). Após o tratamento os blocos foram imersos por 1 min em 1,8 mL de caldo Dey-Engley Neutralizante (HiMedia, Vadhani Industrial Estate, Mumbai, Índia) suplementado com 2,5% de polissorbato (Synth, Labsunth Produtos para Laboratórios Ltda, Diadema – SP, Brasil) e 0,1% de cloridrato de L-cisteína (Synth, Labsunth Produtos para Laboratórios Ltda, Diadema – SP, Brasil). A duração do experimento foi reduzida para 4 dias.

Estudo 5

O procedimento foi realizado de acordo com o Estudo 4 com três blocos de esmalte por grupo, porém os tratamentos foram realizados duas vezes por dia, durante as trocas de meio de cultura. Ainda, os tratamentos iniciaram a partir do primeiro dia, antes da transferência dos blocos de esmalte para o meio McBain sem sacarose.

Estudo 6

O procedimento foi realizado de acordo com o Estudo 5 com três blocos de esmalte por grupo, porém os blocos não foram submetidos a solução neutralizadora e, a concentração de sacarose no meio McBain foi reduzida para 0,5% (Figura 1).

Figura 1- Variáveis avaliadas em cada estudo.

ESTUDO 1	ESTUDO 2	ESTUDO 3	ESTUDO 4	ESTUDO 5	ESTUDO 6
5 blocos	5 blocos	3 blocos	6 blocos	6 blocos	6 blocos
Saliva – voluntário A Saliva aspirada	Saliva – voluntário A Saliva aspirada	Saliva – voluntário B Manutenção da saliva	Saliva – voluntário B Manutenção da saliva	Saliva – voluntário B Manutenção da saliva	Saliva – voluntário B Manutenção da saliva
Amostras de saliva e suspensões mantidas em temperatura ambiente	Amostras de saliva e suspensões mantidas em temperatura ambiente	Amostras de saliva e suspensões mantidas em gelo	Amostras de saliva e suspensões mantidas em gelo	Amostras de saliva e suspensões mantidas em gelo	Amostras de saliva e suspensões mantidas em gelo
Meio com 1% de sacarose/ meio sem sacarose	Meio com 2% de sacarose/ meio com 1% de sacarose	Meio com 1% de sacarose/ meio sem sacarose	Meio com 1% de sacarose/ meio sem sacarose	Meio com 1% de sacarose/ meio sem sacarose	Meio com 0,5% de sacarose/ meio sem sacarose
Tratamento simulado com água destilada 1X/dia	Tratamento simulado com água destilada 1X/dia	Tratamento simulado com água destilada 1X/dia	Tratamento com CHX/Enxag. controle 1X/dia + uso de solução neutralizadora	Tratamento com CHX/Enxag. controle 2X/dia + uso de solução neutralizadora	Tratamento com CHX/Enxag. controle 2X/dia.
5 dias de experimento	5 dias de experimento	5 dias de experimento	4 dias de experimento	4 dias de experimento	4 dias de experimento

Análise dos biofilmes

A acidogenicidade dos biofilmes foi analisada através da aferição do pH após cada troca de meio de cultura, utilizando um eletrodo específico (2A14-JL-Analyser) acoplado a um analisador de íons (720A – Orion Research, EUA).

Ao término do período experimental, os biofilmes formados na superfície de esmalte foram dispersos em 2 mL de solução salina 0,9% utilizando ultrassom por 10 s (Cuba de ultrassom Cristófoli, Campo Mourão – PR, Brasil, 42 kHz). As amostras foram semeadas em ágar BHI (Brighenti et al.⁸, 2012), ágar MSBS (Gold et al.¹⁵, 1973), ágar Rogosa (Rogosa et al.²⁵, 1951) e ágar BHI pH 4,7 (Azevedo et al.⁶, 2014), para isolamento, respectivamente, de bactérias anaeróbias totais, estreptococos do grupo mutans, lactobacilos e bactérias anaeróbias acidúricas, de acordo com a metodologia previamente descrita. O número de Unidades Formadoras de Colônias (UFC) foi obtido com o auxílio de contador de colônias. Os resultados foram expressos em log (1+ UFC/mm²).

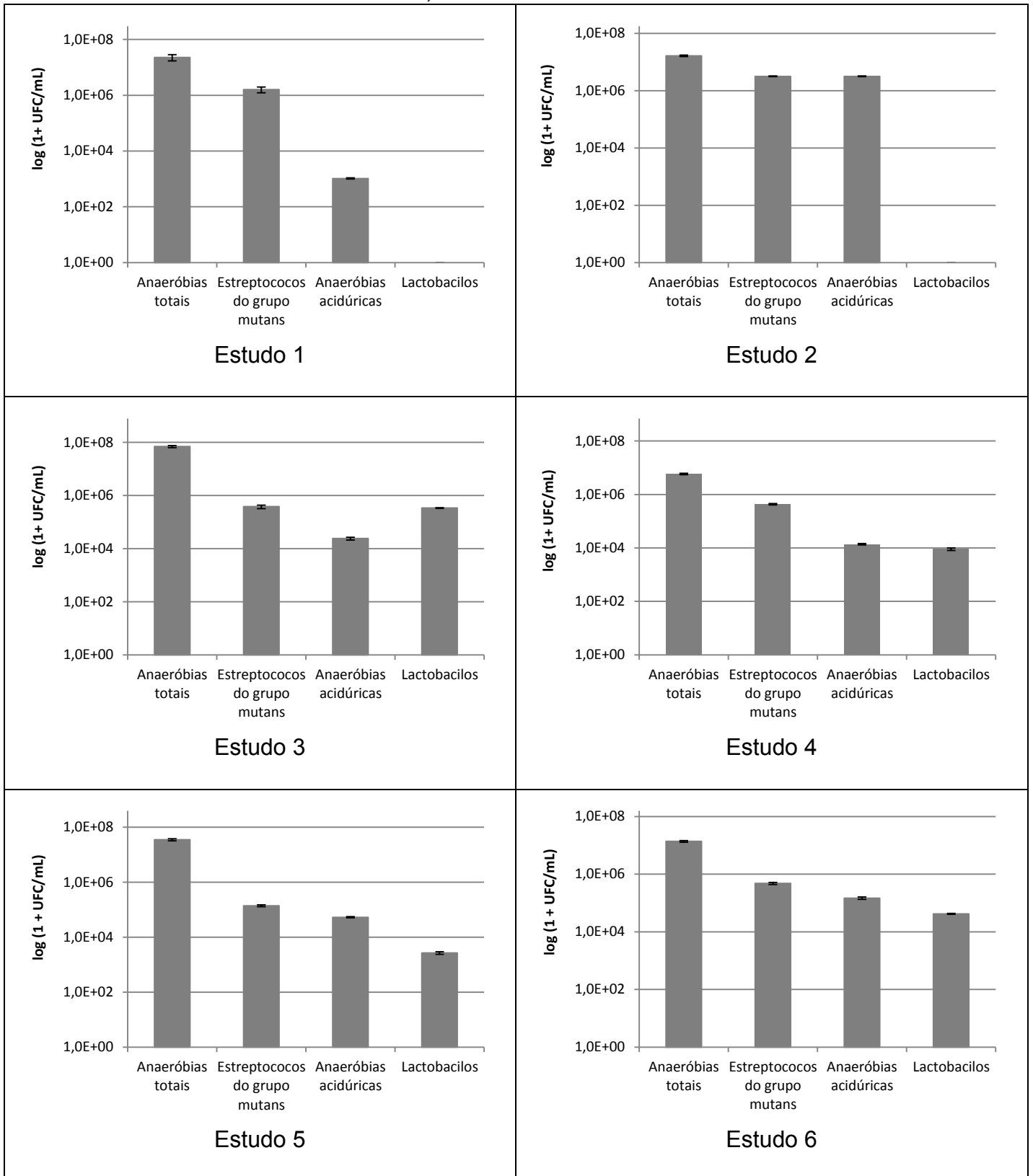
Análise dos dados

Devido ao número reduzido de repetições em cada estudo, os dados foram analisados descritivamente.

Resultados

Os resultados da concentração microbiana inicial da saliva doada nos seis estudos estão apresentados na Figura 2. A média (\pm dp) das concentrações de bactérias presentes nas amostras de saliva utilizadas para os Estudos 1 e 2 (voluntário A) foi de $1,97 \times 10^7$ UFC/mL ($\pm 4,22 \times 10^6$), $2,40 \times 10^6$ UFC/mL ($\pm 1,13 \times 10^6$) e $1,03 \times 10^3$ UFC/mL ($\pm 2,26 \times 10^6$) para, respectivamente, bactérias anaeróbias totais, estreptococos do grupo mutans e bactérias anaeróbias acidúricas. Não houve crescimento de lactobacilos nas amostras de saliva do voluntário A (Estudos 1 e 2), cuja saliva e suspensões do biofilme não foram mantidas em gelo. A média (\pm dp) das concentrações de bactérias presentes nas amostras de saliva utilizadas para os Estudos 3, 4, 5 e 6 (voluntário B) foi de $3,13 \times 10^7$ UFC/mL ($\pm 2,88 \times 10^6$), $3,57 \times 10^5$ UFC/mL ($\pm 1,50 \times 10^5$), $5,99 \times 10^4$ UFC/mL ($\pm 6,16 \times 10^4$) e $9,83 \times 10^4$ UFC/mL ($\pm 1,62 \times 10^5$) para, respectivamente, bactérias anaeróbias totais, estreptococos do grupo mutans, bactérias anaeróbias acidúricas e lactobacilos. As amostras de saliva do voluntário A (Estudo 1 e 2) apresentaram uma concentração homogênea de bactérias anaeróbias totais e estreptococos do grupo mutans ao longo das coletas e uma variação de 3 log na concentração de bactérias acidúricas. As amostras do voluntário B (Estudos 3 a 6) apresentaram uma concentração homogênea de bactérias anaeróbias totais, estreptococos do grupo mutans e bactérias anaeróbias acidúricas e uma variação de até 2 log na concentração de lactobacilos ao longo das coletas.

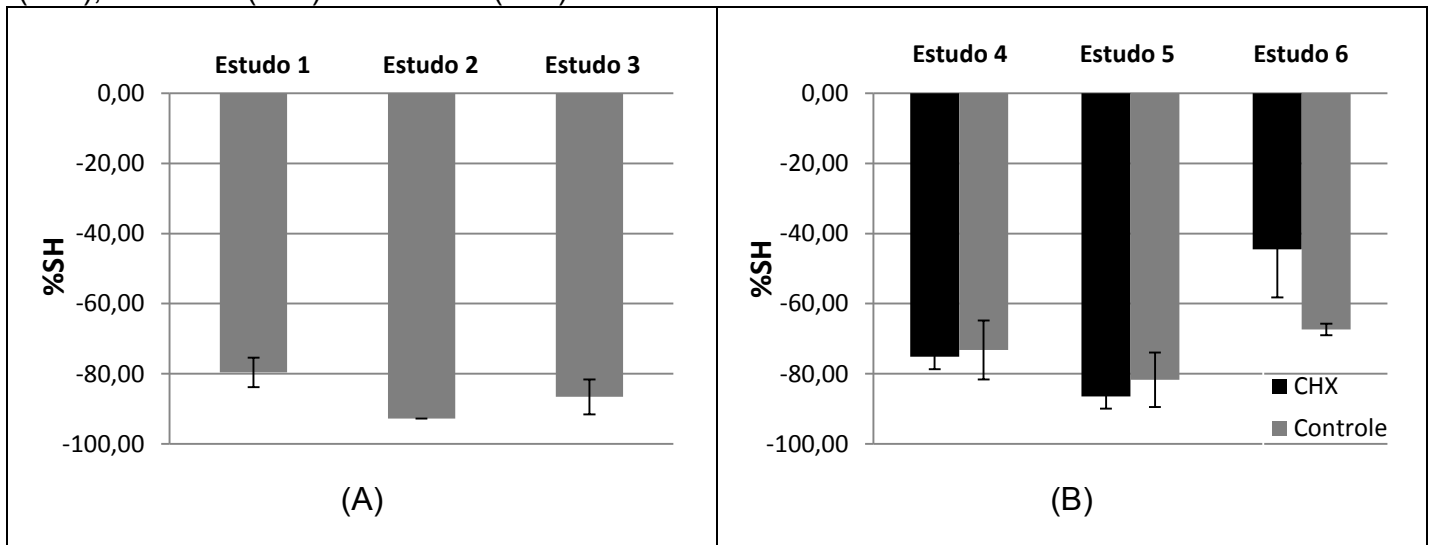
Figura 2- Concentração microbiana inicial da saliva coletada (média \pm dp) para a realização de cada estudo. Estudos 1 e 2: voluntário A; Estudos 3 a 6: voluntário B.



A Figura 3A mostra os resultados de %SH dos estudos cujo tratamento foi simulado com água destilada esterilizada (Estudos 1 a 3). No Estudo 1, a avaliação da dureza final foi realizada em dois blocos de esmalte devido à ausência de crescimento de biofilme na superfície de três blocos de esmalte. No Estudo 2, é apresentada a %SH de somente um dos cinco blocos de esmalte utilizados, pois os quatro blocos restantes apresentaram a superfície do esmalte erodida, o que impossibilitou a realização da análise de microdureza. A %SH para os blocos tratados com água destilada esterilizada nos estudos 1 a 3 variou entre 79,66% e 92,79%.

A Figura 3B mostra os resultados de %SH dos estudos que realizaram testes com a CHX e com o enxaguatório controle (Estudos 4 a 6). A diferença entre a %SH do grupo tratado com enxaguatório controle e com a CHX foi de 1,97% e 4,73% para, respectivamente os Estudos 4 e 5. No Estudo 6, essa diferença foi de 22,85%.

Figura 3- Porcentagem média \pm dp de perda de dureza dos blocos de esmalte. (A) Tratamento com água deionizada: Estudo 1 (n=2), Estudo 2 (n=1) e Estudo 3 (n=3). (B) Tratamento com digluconato de clorexidina 0,12% (CHX) e enxaguatório sem princípio ativo (controle): Estudo 4 (n=6), Estudo 5 (n=6) e Estudo 6 (n=6).

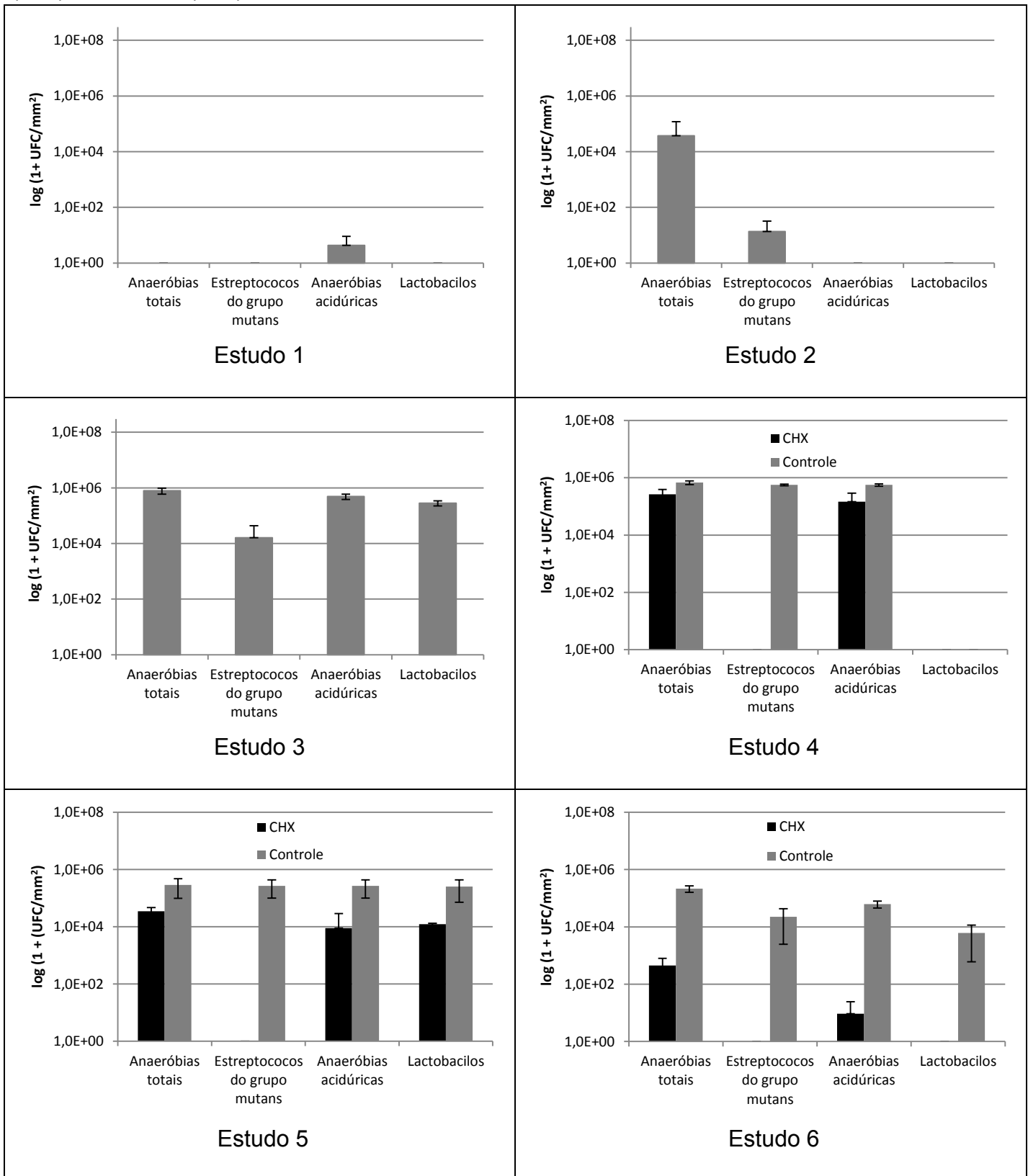


Na Figura 4, observa-se que houve um crescimento microbiano inadequado nas amostras de biofilme tanto no Estudo 1 quanto no Estudo 2. Nesses estudos, as amostras foram manipuladas em temperatura ambiente enquanto que nos Estudos 3 a 6 as amostras foram mantidas em gelo durante todo o procedimento. O Estudo 3 apresentou um crescimento microbiano adequado de todas as amostras.

Nos Estudos 4 a 6, as amostras de biofilme do grupo CHX não apresentaram crescimento de estreptococos do grupo mutans. Houve uma variabilidade na concentração de lactobacilos de 4 log para o grupo CHX e de até 5 log no grupo Controle (Figura 3).

No Estudo 6, não houve o crescimento de estreptococos do grupo mutans e lactobacilos no grupo CHX. Houve uma diferença de 3 log no crescimento de bactérias anaeróbias totais e de 4 log no crescimento de bactérias anaeróbias acidúricas entre os grupos controle e CHX.

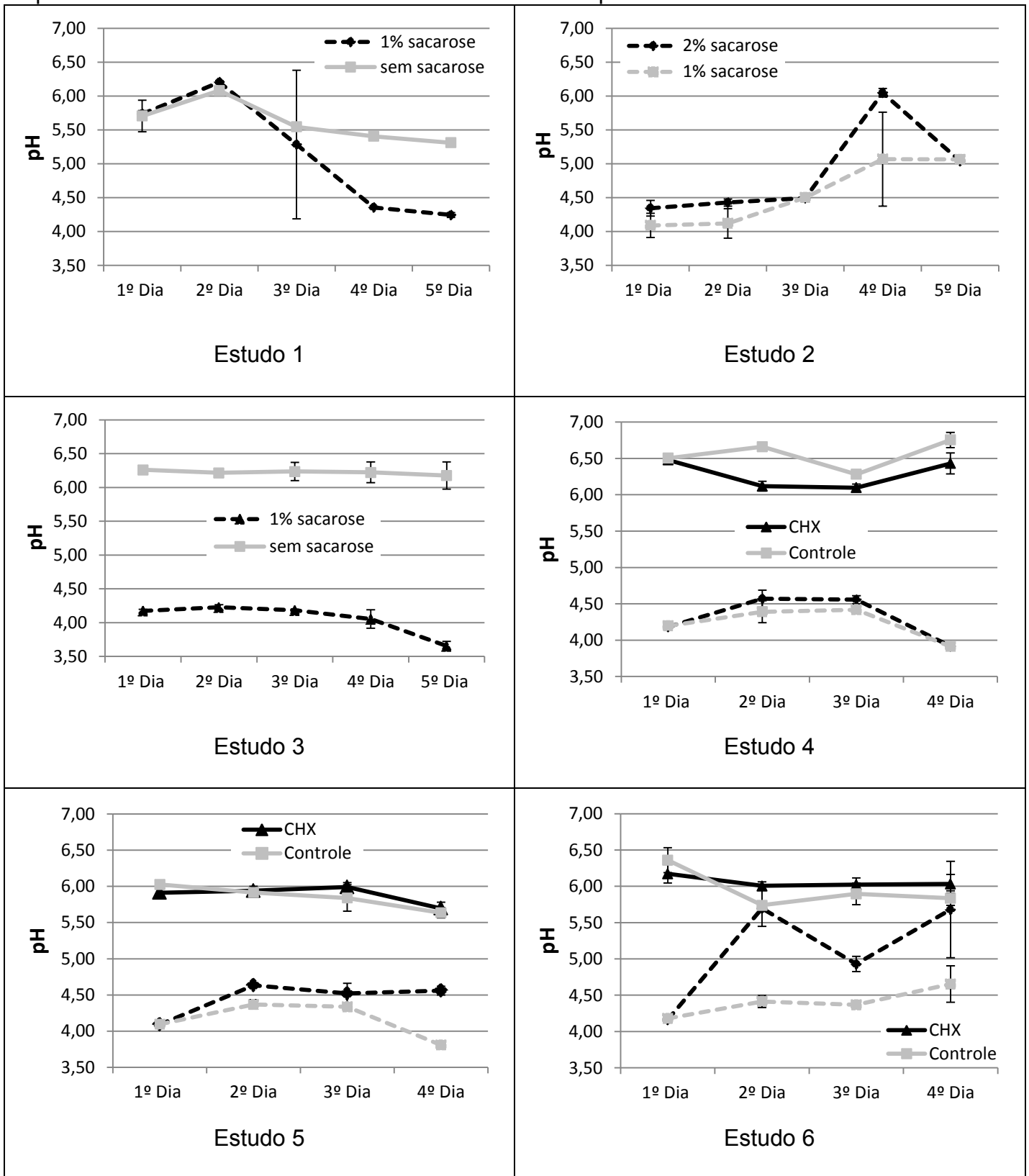
Figura 4- Concentração de bactérias presentes no biofilme formado nos blocos de esmalte (média \pm dp) de cada Estudo. Estudo 1 (n=2), Estudo 2 (n=5), Estudo 3 (n=3), Estudo 4 (n=6), Estudo 5 (n=6) e Estudo 6 (n=6).



No Estudo 1, a acidogenicidade do biofilme atingiu o nível crítico de desmineralização do esmalte (5,5) a partir do terceiro dia de experimento tanto para o meio de cultura suplementado com sacarose quanto para o meio de cultura sem a suplementação. No Estudo 2, a acidogenicidade do biofilme ficou abaixo do nível crítico a partir do primeiro dia em ambos os meios, aumentando gradualmente nos dias subsequentes. No Estudo 3, a acidogenicidade do biofilme em meio de cultura suplementado com 1% de sacarose esteve abaixo do pH crítico do esmalte a partir do primeiro dia de crescimento do biofilme e os valores de pH dos biofilmes em meio de cultura sem sacarose permaneceram próximos à neutralidade durante todo o experimento. Esse mesmo padrão de acidogenicidade foi observado nos Estudos 4 e 5, tanto para o grupo controle quanto para o grupo CHX (Figura 5).

No Estudo 6, a acidogenicidade do meio de cultura com 0,5% de sacarose para os biofilmes tratados com CHX ficou próxima ao valor do pH crítico do esmalte (5,5), permanecendo acima dos valores críticos no segundo e no quarto dia do experimento. Os biofilmes tratados com o enxaguatório controle apresentaram valores próximos ao pH 4,5.

Figura 5- Acidogenicidade (média \pm dp) do Estudo 1 (n=5), Estudo 2 (n=5), Estudo 3 (n=3), Estudo 4 (n=6), Estudo 5 (n=6) e Estudo 6 (n=6). Linhas tracejadas correspondem ao meio suplementado com sacarose e as linhas contínuas correspondem ao meio sem sacarose.



Discussão

O presente estudo procurou validar uma metodologia simples, eficaz e acessível de indução de cárie *in vitro* em um curto período de tempo, a fim de possibilitar a realização de testes de atividade antimicrobiana de formulações farmacêuticas. Procurou, ainda, adaptar a metodologia proposta por van de Sande et al.³⁰ (2001) para o uso de um meio de cultura alternativo. O meio de cultura DMM, utilizado no estudo de van de Sande et al.³⁰ (2011) foi elaborado por Wong e Sissons²⁷ (2001) e é adequado para a cultura *in vitro* de biofilmes polimicrobianos, pois atua como um análogo da saliva natural. Porém, devido à grande variedade de substâncias envolvidas, esse meio de cultura possui alto custo e demanda um longo período de preparo. Assim, foi proposto o uso do meio McBain, que também se mostrou eficaz para a cultura *in vitro* de biofilmes polimicrobianos (McBain et al.²¹, 2005). Seu modo de preparo é mais simples, e o custo de seus componentes é menor, o que favorece o uso desse meio em larga escala.

Neste estudo, foi utilizado um modelo de biofilme polimicrobiano obtido a partir da saliva para mimetizar o biofilme formado *in vivo* (Sissons²⁷, 1997), associado a um modelo de adesão ativa, que propicia a formação de um biofilme somente com células capazes de aderirem aos espécimes e não favorece a aderência de micro-organismos pela força da gravidade (Exterkate et al.¹³, 2010).

Foram utilizados blocos de esmalte bovinos por responderem 30% mais rapidamente a desafios cariogênicos do que o esmalte de dentes humanos (White et al.³⁵, 2010), o que auxilia na busca de um modelo que demanda pouco tempo de execução.

O Estudo 1 foi realizado baseado no modelo original proposto por van de Sande et al.³⁰ (2011), com substituição do meio de cultura. Apesar de esse modelo ter apresentado uma %SH satisfatória nos blocos de esmalte (próximo a 80%), observou-se que o biofilme cresceu somente em 40% dos espécimes. Ainda, a média dos valores de pH do biofilme em meio com 1% de sacarose (5,17) não corrobora com a média (4,6) descrita no trabalho de van de Sande et al.³⁰ (2011).

Devido à ausência de crescimento de biofilme em 60% dos espécimes no Estudo 1, o Estudo 2 foi realizado com concentrações maiores de sacarose. Contudo, esse modelo provocou um grande desafio cariogênico, uma vez que foi observada erosão em 80% dos espécimes utilizados. Esses resultados corroboram com os valores de pH obtido para os meios de cultura suplementados com sacarose, que permaneceram abaixo do valor crítico do esmalte durante quase todo o experimento. Porém, apesar dos valores de pH terem sido baixos, houve um pequeno aumento ao longo dos dias de teste ao invés de permanecer estável. Isso ocorreu devido aos valores baixos de pH observados no primeiro dia tanto no meio de cultura com 1% de sacarose quanto no meio de cultura com 2% de sacarose, que podem ter prejudicado o metabolismo bacteriano e levado ao aumento gradual ao longo do experimento.

Esses resultados levantaram a hipótese de que a saliva do voluntário A não tinha uma composição adequada para o desenvolvimento satisfatório de lesões de cárie. O uso de somente um voluntário foi proposto por van de Sande et al.³⁰ (2011) com base em um estudo anterior, no qual observaram que os biofilmes dentários produzidos a partir de amostras de saliva de voluntários com experiências variadas de cárie não apresentaram uma diferença estatisticamente significativa na desmineralização do esmalte (Azevedo et al.⁶, 2011). Essa constatação está

consistente com a Teoria Ecológica da Etiologia da Cárie Dentária (Marsh¹⁸, 1994), na qual lesões de cárie se desenvolvem devido a uma quebra do equilíbrio da microbiota provocada por uma mudança no ambiente bucal. Entretanto, o estudo de van de Sande et al.³⁰ (2011) não apresentou o perfil microbiológico da saliva do doador utilizado e, conforme observado no presente estudo, houve uma diferença no padrão de crescimento de biofilme entre os dois voluntários utilizados. Ainda, a concentração microbiana no biofilme formado também não foi incluída no trabalho, o que dificultou a análise comparativa entre os biofilmes formados.

As amostras de saliva e as suspensões de biofilme foram manipuladas em temperatura ambiente nos Estudos 1 e 2. Isso pode ter contribuído para o baixo crescimento de biofilme no Estudo 1 e pelo crescimento de somente uma parte dos grupos microbianos nos biofilmes no Estudo 2. Portanto, no Estudo 3 todas as amostras foram mantidas em gelo e foi estabelecido a não aspiração da saliva inoculada na tentativa de auxiliar no crescimento dos micro-organismos.

No Estudo 3, observou-se o crescimento de todos os grupos microbianos avaliados (bactérias anaeróbias totais, estreptococos do grupo mutans, bactérias anaeróbias acidúricas e lactobacilos) em concentração suficiente tanto na amostra de saliva quanto nas amostras de biofilmes. Isso demonstra que a saliva do voluntário B possui uma concentração microbiana adequada e que a manutenção das amostras em gelo e a não aspiração da saliva auxiliou na formação do biofilme. Os valores médios de pH dos biofilmes em meio suplementado com 1 % de sacarose (4,06) e em meio sem sacarose (6,22) estão próximos dos encontrados no modelo desenvolvido por van de Sande et al.³⁰ (2011). Ficou estabelecido o uso da saliva desse voluntário para a realização de testes com digluconato de clorexidina

0,12% (CHX) e com o controle negativo. A duração total do experimento foi reduzida para quatro dias devido à grande queda de pH observada no último dia do Estudo 3.

Os resultados do Estudo 4 mostram que não houve crescimento de estreptococos do grupo mutans e lactobacilos no grupo CHX. Porém, a acidogenicidade do biofilme e a %SH foram semelhantes ao grupo controle, o que caracterizou a existência de um alto desafio cariogênico. Portanto, no Estudo 5, o tratamento dos biofilmes foi realizado a partir do primeiro dia de experimento, antes da transferência dos blocos para o meio McBain sem sacarose e, a partir do 2º dia, o tratamento foi realizado duas vezes ao dia, antes de cada troca de meio de cultura.

Apesar das modificações propostas, a diferença de %SH entre os grupos CHX e controle permaneceram semelhantes, o que continua caracterizando alto desafio cariogênico no modelo proposto. Assim, no Estudo 6, a concentração de sacarose foi reduzida de 1% para 0,5% e não foi utilizada a solução neutralizadora após o tratamento, a exemplo do estudo original de van de Sande et al.³⁰ (2011). A solução neutralizadora foi incluída como variável nos estudos devido à substantividade da clorexidina (Elworthy et al.¹², 1996).

Os resultados do Estudo 6 mostram que as modificações realizadas resultaram no alcance do objetivo proposto. A diferença entre os grupos controle e CHX foi da ordem de 4 log para estreptococos do grupo mutans e lactobacilos e de 3 log para bactérias anaeróbias totais e bactérias anaeróbias acidúricas. Houve uma diferença de 22,9% na %SH entre os grupos.

Com base nos resultados dos seis estudos, observa-se que foram necessárias diversas modificações ao longo dos estudos para conseguir uma ação

efetiva da clorexidina, o que pode ser atribuído à sua dificuldade de ação em biofilmes maduros (Vitkov et al.³³, 2005; Zanata et al.³⁷, 2007).

Nesse trabalho, observou-se que o crescimento satisfatório do biofilme e a desmineralização adequada do esmalte foram afetados pelas diversas variáveis incluídas no estudo, além das características da saliva doada. Ainda, a eficácia da CHX no controle da formação de biofilme foi afetada pelo uso da solução neutralizadora e pelas concentrações de sacarose propostas no regime semi-contínuo.

Conclusão

Conclui-se que resultados satisfatórios foram obtidos quanto à desmineralização, concentração microbiana e acidogenicidade dos biofilmes após a avaliação das diversas variáveis propostas. O regime cariogênico ideal para o teste de atividade antimicrobiana de formulações farmacêuticas experimentais com o meio McBain ficou estabelecido com o uso de 0,5% de sacarose, com a manutenção da saliva após a inoculação inicial, com a realização de uma exposição às soluções de tratamento no primeiro dia e de duas exposições no segundo ao quarto dia, sem o uso da solução neutralizadora e com a duração do experimento de quatro dias.

Agradecimentos

Nossos agradecimentos ao Prof. Dr. Maximiliano Sérgio Cenci, aos voluntários do trabalho, ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico - CNPq (444195/2014-9) e à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo – FAPESP (2013/12547-4) pelo suporte financeiro.

Referências*

1. Afonso RL, Pessan JP, Igreja BB, Cantagallo CF, Danelon M, Delbem ACB. In situ protocol for the determination of dose response effect of low-fluoride dentifrices on enamel remineralization. *J Appl Oral Sci.* 2013; 21(6): 525-32.
2. Argenta RMO, Tabchoury CPM, Cury JA. A modified pH-cycling model to evaluate fluoride effect on enamel demineralization. *Pesqui Odontol Bras.* 2003; 17(3): 241-6.
3. Arnold WH, Gaengler P, Sabov K, Schmitz I, Gedalia I, Steinberg D. Induction and 3D reconstruction of caries-like lesions in an experimental dental plaque biofilm model. *J Oral Rehabil.* 2001; 28(8): 748-54.
4. Arthur RA, Waeiss RA, Hara AT, Lippert F, Eckert GJ, Zero DT. A defined-multispecies microbial model for studying enamel caries development. *Caries Res.* 2013; 47(4): 318-24.
5. Azevedo MS, van de Sande FH, Romano AR, Cenci MS. Microcosm biofilms originating from children with different caries experience have similar cariogenicity under successive sucrose challenges. *Caries Res.* 2011; 45(6): 510-7.
6. Azevedo MS, van de Sande FH, Maske TT, Signori C, Romano AR, Cenci MS. Correlation between the cariogenic response in biofilms generated from saliva of mother/child pairs. *Biofouling.* 2014; 30(8): 903-9.
7. Bowden GH. Controlled environment model for accumulation of biofilms of oral bacteria. *Methods Enzymol.* 1999; 310: 216-24.

*De acordo com o manual da FOAr/UNESP, adaptadas das normas Vancouver. Disponível no site: <http://www.foar.unesp.br/#!/biblioteca/manual>

8. Brighenti FL, Gaetti-Jardim E Jr, Danelon M, Evangelista GV, Delbem AC. Effect of *Psidium cattleianum* leaf extract on enamel demineralisation and dental biofilm composition in situ. *Arch Oral Biol.* 2012; 57(8): 1034-40.
9. Cheng L, Exterkate RAM, Zhou X, Li J, ten Cate JM. Effect of *Galla chinensis* on growth and metabolism of microcosm biofilms. *Caries Res.* 2011; 45(2): 87-92.
10. Cury JA, do Amaral RC, Tenuta LM, Del Bel Cury AA, Tabchoury CP. Low-fluoride toothpaste and deciduous enamel demineralization under biofilm accumulation and sucrose exposure. *Eur J Oral Sci.* 2010; 118(4): 370-5.
11. Dummer PMH, Edmunds DH, Green RM. Desmineralization of human enamel by *Streptococcus mutans* NCTC 10832 using a sequential batch culture technique. *Caries Res.* 1982; 16(2): 193-6.
12. Elworthy A, Greenman J, Doherty FM, Newcombe RG, Addy M. The substantivity of a number of oral hygiene products determined by the duration of effects on salivary bacteria. *J Periodontol.* 1996; 67(6): 572-6.
13. Exterkate RA, Crielaard W, ten Cate JM. Different response to amine fluoride by *Streptococcus mutans* and polymicrobial biofilms in a novel high-throughput active attachment model. *Caries Res.* 2010; 44(4): 372-9.
14. Gilmour ASM, Edmunds DH. The production of secondary caries-like lesions on cavity walls and the assessment of microleakage using an in vitro microbial caries system. *J Oral Rehabil.* 1990; 17(6): 573-8.
15. Gold OG, Jordan HV, Van Houte J. A selective medium for *Streptococcus mutans*. *Arch Oral Biol.* 1973; 18(11): 1357-64.

16. Hayati F, Okada A, Kitasaki Y, Tagami J, Matin K. An artificial biofilm induced secondary caries model for in vitro studies. *Aust Dent J.* 2011; 56(1): 40-7.
17. Hsu CYS, Donly KJ, Drake DR, Wefel JS. Effects of aged fluoride-containing restorative materials on recurrent root caries. *J Dent Res.* 1998; 77(2): 418-25.
18. Marsh PD. Microbial ecology of dental plaque and its significance in health and disease. *Adv Dent Res.* 1994; 8(2): 263-71.
19. Marsh PD. The role of microbiology in models of dental caries. *Adv Dent Res.* 1995; 9(3): 244-54.
20. McBain AJ. Chapter 4: In vitro biofilm models: an overview. *Adv Appl Microbiol.* 2009; 69: 99-132.
21. McBain AJ, Sissons C, Ledder RG, Sreenivasan PK, De Vizio W, Gilbert P. Development and characterization of a simple perfused oral microcosm. *J Appl Microbiol.* 2005; 98(3): 624-34.
22. Pham LC, van Spanning RJM, Roling WFM, Prospero AC, Terefework Z, ten Cate JM, Crielaard W, Zaura E. Effects of probiotic *Lactobacillus salivarius* W24 on the compositional stability of oral microbial communities. *Arch Oral Biol.* 2009; 54(2): 132-7.
23. Queiroz CS, Hara AT, Paes Leme AF, Cury JA. pH-cycling models to evaluate the effect of low fluoride dentifrice on enamel de- and remineralization. *Braz Dent J.* 2008; 19(1): 21-7.

24. Rodrigues E, Delbem ACB, Pedrini D, Oliveira MSR. pH-cycling model to verify the efficacy of fluoride-releasing materials in enamel demineralization. *Oper Dent*. 2008; 33(6): 658-65.
25. Rogosa M, Mitchell JA, Wiseman RF. A selective medium for the isolation and enumeration of oral fecal lactobacilli. *J Bacteriol*. 1951; 62(1): 132-3.
26. Shu M, Wong L, Miller JH, Sissons CH. Development of multi-species consortia biofilms of oral bacteria as an enamel and root caries model system. *Arch Oral Biol*. 2000; 45(1): 27-40.
27. Sissons CH. Artificial dental plaque biofilm model systems. *Adv Dent Res*. 1997; 11(1): 110-26.
28. ten Cate JM, Mundorff-Shrestha SA. Working Group Report 1: Laboratory models for caries (in vitro and animal models). *Adv Dent Res*. 1995; 9(3): 332-4.
29. Tenuta LMA, Ricomini Filho AP, Del Bel Cury AA, Cury JA. Effect of sucrose on the selection of mutans streptococci and lactobacilli in dental biofilm formed in situ. *Caries Res*. 2006; 40(6): 546-9.
30. van de Sande FH, Azevedo MS, Lund RG, Huysmans MC, Cenci MS. An in vitro biofilm model for enamel demineralization and antimicrobial dose-response studies. *Biofouling*. 2011; 27(9): 1057-63.
31. Viana PGS. Esterilização de esmalte bovino por meio de irradiação por microondas. Efeito sobre a microdureza superficial e resistência à desmineralização. [dissertação de mestrado]. Araraquara: Faculdade de Odontologia da Unesp; 2009.

32. Vieira AE, Delbem AC, Sasaki KT, Rodrigues E, Cury JA, Cunha RF. Fluoride dose response in pH-cycling models using bovine enamel. *Caries Res.* 2005; 39(6): 514-20.
33. Vitkov L, Hermann A, Krautgartner WD, Hermann M, Fuchs K, Klappacher M, Hanning M. Chlorhexidine-induced ultrastructural alterations in oral biofilm. *Microsc Res Tech.* 2005; 68(2): 85-9.
34. White DJ. The application of in vitro models to research on demineralization and remineralization of the teeth. *Adv Dent Res.* 1995; 9(3): 175-93.
35. White AJ, Yorath C, ten Hengel V, Leary SD, Huysmans MC, Barbour ME. Human and bovine enamel erosion under “single-drink” conditions. *Eur J Oral Sci.* 2010; 118(6): 604-9.
36. Wong L, Sissons C. A comparison of human dental plaque microcosm biofilms grown in an undefined medium and a chemically defined artificial saliva. *Arch Oral Biol.* 2001; 46(6): 477-86.
37. Zanata FB, Antoniazzi RP, Rosing CK. The effect of 0.12% chlorhexidine gluconate rinsing on previously plaque-free and plaque-covered surfaces: a randomized, controlled clinical trial. *J Periodontol.* 2007; 78(11): 2127-34.
38. Zero DT. *In situ* caries models. *Adv Dent Res.* 1995; 9(3): 214-30.
39. Zero DT, Fu J, Anne KM, Cassata S, McCormack SM, Gwinner LM. An improved intra-oral enamel demineralization test model for the study of dental caries. *J Dent Res.* 1992; 71(Spec): 871-8.

40. Zhang K, Fang L, Imazato S, Cheng L, Liu H, Arola DD, Bai Y, Xu HHK. Dual antibacterial agents of nano-silver and 12-methacryloyloxydodecylpyridinium bromide in dental adhesive to inhibit caries. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater.* 2013; 101(6): 929-38.

CAPÍTULO 2

Avaliação in vitro de um enxaguatório bucal contendo óleo essencial de *Croton doctoris* S. Moore na desmineralização do esmalte e na composição do biofilme polimicrobiano*

Albuquerque YE¹, Danelon M², Delbem ACB², Delbem ACB², Salvador MJ³, Koga-Ito CY⁴, Brighenti FL¹.

¹UNESP – Faculdade de Odontologia de Araraquara, Departamento de Clínica Infantil, Araraquara – SP, Brasil.

²UNESP – Faculdade de Odontologia de Araçatuba, Departamento de Odontologia Infantil e Social, Araçatuba – SP, Brasil.

³UNICAMP – Instituto de Biologia, Departamento de Biologia Vegetal – Campinas – SP, Brasil.

⁴UNESP – Instituto de Ciências e Tecnologia, Departamento de Engenharia Ambiental - São José dos Campos – SP, Brasil.

Autor correspondente:

Fernanda Lourenção Brighenti

Rua Humaitá, 1680 – Centro

Araraquara – SP

CEP: 14801 – 903

Tel: +55 (16) 33016551

E-mail: fbrighenti@foar.unesp.br

*De acordo com o manual da FOAr/UNESP, adaptadas das normas Vancouver. Disponível no site: <http://www.foar.unesp.br/#!/biblioteca/manual>

Resumo

O objetivo desse trabalho foi avaliar a atividade antimicrobiana de um enxaguatório bucal a base de óleo essencial de *C. doctoris* sobre biofilmes polimicrobianos provenientes da saliva. O óleo essencial foi obtido através de hidrodestilação e sua concentração inibitória mínima (CIM) e bactericida mínima (CBM) foram determinadas através da técnica de microdiluição em caldo. Um enxaguatório bucal sem óleo essencial e digluconato de clorexidina 0,12% foram utilizados, respectivamente, como controle negativo e positivo. Os blocos de esmalte foram submetidos a um modelo de indução de cárie in vitro e tratados por quatro dias. Os biofilmes desenvolvidos foram analisados quanto a sua composição microbiológica e acidogenicidade. A desmineralização do esmalte (%SH) foi determinada através da microdureza de superfície. Os resultados de CIM e CBM foram analisados descritivamente. Os demais dados foram submetidos a testes não paramétricos utilizando o programa GraphPad Prism versão 3.02. A CIM e a CBM do óleo essencial e da CHX foram, respectivamente, 0,625% e 1,250%, 0,004% e 0,008%. Observou-se que o enxaguatório com óleo essencial não apresentou diferença estatística com o grupo controle negativo ($p > 0,05$) em todos os parâmetros analisados, exceto para a concentração de lactobacilos no biofilme. A CHX apresentou diferença estatisticamente significativa em relação ao controle negativo em todas as análises ($p < 0,001$). Conclui-se que o óleo essencial possui atividade antimicrobiana contra micro-organismos em suspensão provenientes da saliva, porém sua ação em concentração equivalente a CIM não é eficaz no controle do biofilme dentário.

Palavras-chave: Óleo de *Croton*, produtos biológicos, produtos com ação antimicrobiana.

Introdução

A cárie dentária constitui o maior problema de saúde bucal em muitos países industrializados, por afetar 60-90% das crianças em idade escolar e a grande maioria dos adultos (World Health Organization⁴⁷, 2010). A remoção mecânica do biofilme da superfície dentária constitui o método mais adequado para a prevenção da cárie (Pinto³¹, 2000), uma vez que ele constitui o principal fator etiológico local dessa doença (Zanela et al.⁴⁹, 2002). Entretanto, o uso de substâncias antimicrobianas pode auxiliar a reverter o risco de cárie até que bons hábitos de higiene bucal sejam estabelecidos, o que é particularmente útil em crianças ou pacientes com dificuldades motoras (Pereira et al.²⁹, 2010).

Entre as substâncias antimicrobianas disponíveis para uso na cavidade bucal, destaca-se a clorexidina, que possui amplo espectro de ação e forte adsorção às superfícies bucais (Zanatta et al.⁴⁸, 2007). Entretanto, o uso prolongado dessa substância não é indicado devido aos diversos efeitos colaterais que ela apresenta, como o manchamento dos dentes, descamação reversível da mucosa, alterações do paladar e aumento de calcificados supragengivais (Torres³⁹, 2000). Portanto, há a necessidade de serem desenvolvidos produtos de igual efetividade, porém com menos efeitos colaterais.

Produtos naturais de origem vegetal têm sido utilizados como principal fonte de agentes terapêuticos inovadores e efetivos (Jeon et al.¹⁵, 2011). Considerando a grande biodiversidade do território brasileiro, o Governo Federal reconheceu, por meio da criação da “Política Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterapia” (Decreto Federal nº 5.813, de 22 de junho de 2006¹⁰) o potencial de plantas como fonte de moléculas bioativas para gerar produtos de interesse ao SUS. Esse Decreto resultou

na criação, em 2009 da Relação Nacional de Plantas Medicinais de Interesse ao SUS (Rennisus).

Croton spp., pertencente à família Euphorbiaceae, é um dos incluídos na lista de 71 plantas do Rennisus. *Croton doctoris* S. Moore é uma planta encontrada no Pantanal brasileiro. Embora seu potencial farmacológico seja pouco explorado, há evidências da atividade antimicrobiana do extrato bruto contra bactérias de relevância cariogênica (Brighenti et al.⁵, 2014).

Os óleos essenciais constituem-se de líquidos oleosos obtidos a partir de diversas partes da planta, como flores, folhas, frutos, sementes, gramas, raízes, rizomas e caules (Tisserand, Balacs³⁸, 1999). Embora sejam normalmente utilizados como flavorizantes, os óleos essenciais também possuem atividade antimicrobiana (Mourey, Canillac²⁵, 2002), antiviral (Bishop³, 1995), antimicótica (Mari et al.¹⁹, 2003), antiparasítica (Pessoa et al.³⁰, 2002) e inseticida (Karpouhtsis et al.¹⁶, 1998). Essas propriedades estão diretamente relacionadas com funções necessárias à sobrevivência vegetal que exercem papel fundamental na defesa contra microrganismos (Siqui et al.³⁵, 2000). Por esses motivos, óleos essenciais estão sendo cada vez mais utilizados na indústria farmacêutica, cosmética e alimentícia como uma alternativa aos produtos sintéticos (Montanari²⁴, 2010).

Apesar da existência de evidências da atividade antimicrobiana do extrato bruto, pesquisas com o óleo essencial de *Croton doctoris* S. Moore devem ser realizadas a fim de comprovar o seu potencial antimicrobiano e dessa forma tornar possível a formulação de novos produtos. As vantagens do uso do óleo essencial sobre o extrato bruto de plantas é que eles são mais fáceis de serem incorporados

em formulações farmacêuticas e apresentam aroma, palatabilidade e aparência mais agradável, sendo mais aceitos pela população.

O objetivo desse trabalho foi estudar a atividade antimicrobiana e desenvolver um enxaguatório bucal a base de óleo essencial de *C. doctoris*, avaliando: 1) A atividade antimicrobiana do óleo essencial contra micro-organismos em suspensão provenientes da saliva; 2) A capacidade do enxaguatório em impedir a desmineralização do esmalte; 3) Sua interferência na composição microbiológica do biofilme utilizando um modelo para indução de cárie in vitro.

Materiais e métodos

As aprovações éticas foram concedidas pelo Comitê de Ética em Pesquisa em Seres Humanos (CEP) (Parecer de Aprovação: 405.841) (Anexo 1) e pela Comissão de Ética no Uso de Animal (CEUA) (Parecer de aprovação: 28/2013) (Anexo 2) da Faculdade de Odontologia de Araraquara – UNESP.

Obtenção do óleo essencial

As folhas de *C. doctoris* foram coletadas e identificadas pelo botânico Antônio Arantes Sobrinho durante o período de cheia do Pantanal (entre outubro e março). O óleo essencial foi obtido através da hidrodestilação das folhas frescas da espécie vegetal por 3 h utilizando aparelho de Clevenger modificado. Na hidrodestilação, o vapor d'água carrega consigo o óleo contido no interior ao atravessar o material vegetal. A retirada da água foi realizada com sulfato de sódio anidro e seu rendimento em massa foi determinado (rendimento = $[\text{massa final}/\text{massa inicial}] * 100$). O óleo obtido foi diluído em propilenoglicol na proporção 9:1 (v/v).

Obtenção do inóculo polimicrobiano da saliva e condições de crescimento

Foi utilizado um modelo *in vitro*, proposto por Sissons³⁶ (1997), que utiliza um inóculo polimicrobiano proveniente da microbiota natural para mimetizar o biofilme formado *in vivo*.

Para a obtenção do inóculo polimicrobiano, na manhã do experimento, foi coletada saliva fresca, de um voluntário em jejum, que permaneceu por 24 h sem escovar os dentes e que não utilizou antibióticos ou antifúngicos nos últimos seis meses (van de Sande et al.⁴⁰, 2011). Foi utilizado o meio de cultura proposto por McBain et al.²³, 2005 com e sem a adição de sacarose. Esse meio é composto por mucina gástrica suína (2,5 g/L), peptona bacteriológica (2,0 g/L), triptona (2,0 g/L), extrato de levedura (1,0 g/L) NaCl, (0,35g/L), KCl (0,2 g/L), CaCl₂ (0,2 g/L), cloridrato de cisteína (0,1 g/L), hemina, (0,001 g/L) e vitamina K1 (0,0002 g/L), pH 7,0 (McBain et al.²³, 2005).

Uma alíquota de saliva foi processada para determinação da concentração microbiana inicial. Foram quantificadas a concentração de bactérias anaeróbias totais em ágar BHI (Brighenti et al.⁴, 2012), de estreptococos do grupo mutans em ágar Mitis Salivarius suplementado com 20% de sacarose e 0,2 UI/mL bacitracina (MSBS) (Gold et al.¹⁴, 1973), de lactobacilos em ágar Rogosa (Rogosa et al.³³, 1951) e de bactérias anaeróbias acidúricas em ágar BHI pH 4.7 (Azevedo et al.², 2014). O ágar BHI foi incubado em anaerobiose (5-10% CO₂; <1% O₂; Anaerobac - Probac do Brasil Produtos Bacteriológicos Ltda, Santa Cecília, SP, Brasil), através de gerador de anaerobiose (Anaerobac - Probac do Brasil Produtos Bacteriológicos Ltda, Santa Cecília, SP, Brasil) a 37 °C por 48 h; o ágar MSBS e ágar Rogosa foram incubados em microaerofilia a 37 °C por 48 h; e o ágar BHI pH 4,7 em microaerofilia a 37 °C por

96 h. O número de Unidades Formadoras de Colônias (UFC) foi obtido com o auxílio de contador de colônias (Phoenix Lufenco CP 600 Plus, Araraquara – SP, Brasil). Os resultados foram expressos em log (1+UFC/mL).

Determinação da concentração inibitória mínima (CIM) e concentração bactericida mínima (CBM)

A atividade antimicrobiana inicial do óleo essencial foi determinada através da técnica de microdiluição em caldo. Como substância de referência (controle positivo), foi utilizado digluconato de clorexidina 0,12% (“CHX”, Periogard®). Como controle negativo, foi utilizado o diluente do óleo essencial (propilenoglicol/meio de cultura na proporção 9:1v/v).

O enxaguatório utilizado como controle positivo é constituído por: água, glicerina, álcool etílico, polissorbato 20, digluconato de clorexidina, sabor, sacarina sódica, FD&C azul nº 1 (CI 42090) (dados apresentados na embalagem do produto).

No primeiro poço da placa de 96 poços, foram acrescentados 50 µL do óleo essencial e 50 µL de meio McBain duas vezes concentrado. Em seguida, diluições seriadas de razão dois foram obtidas de modo a serem testadas concentrações entre 0,005 e 5% (v/v) do óleo essencial e entre 0,0001 e 0,06% (w/v) do digluconato de clorexidina 0,12%. Da saliva coletada, 20 µL foram adicionados em cada poço. A placa foi incubada em anaerobiose a 37°C por 24 h. Os poços foram submetidos a uma subcultura em ágar para avaliação da presença de crescimento bacteriano. A avaliação da presença de crescimento bacteriano foi realizada através de inspeção visual. Os experimentos foram realizados em duplicata. A CIM foi determinada como a menor concentração capaz de inibir o crescimento, porém não em 100% e a CBM

foi determinada como a menor concentração capaz de inibir totalmente o crescimento microbiano.

Avaliação in vitro da formulação farmacêutica para uso oral utilizando esmalte de dente bovino e biofilmes polimicrobianos

Elaboração de formulação farmacêutica para uso oral

O enxaguatório bucal utilizado foi constituído por: água destilada, glicerina, metilparabeno, óleo de mamona hidrogenado, cocoamidopropilbetaína, fosfato de sódio, corante, sacarina, polivinilpirrolidona e o óleo essencial em concentração equivalente à CIM seguindo metodologia descrita por Cordeiro et. al.⁹, 2006 e Farmacopéia Brasileira¹³, 1996, com modificações. O enxaguatório controle foi preparado contendo todos os excipientes, exceto o princípio ativo (óleo essencial). Todos os procedimentos foram realizados em duplicata. O controle de qualidade dos enxaguatórios após sua manipulação foi realizado através dos testes de CIM e CBM (dados não mostrados).

Preparo e seleção dos blocos de esmalte

Foram utilizados incisivos centrais inferiores permanentes obtidos de bovinos com idade entre 2 e 3 anos e mantidos previamente em formol a 2% pH 7,0 durante 30 dias. Blocos de esmalte bovino (4 x 4 mm) foram preparados a partir da porção mais plana da superfície vestibular das coroas utilizando cortadeira elétrica (Buehler, Lake Bluff, USA and Mitutoyo Corporation, Kanagawa, Japan). Após a obtenção dos blocos de esmalte, a dentina foi planificada e o esmalte foi polido com o uso de uma

politriz (Buehler, Lake Bluff, IL, USA), lixas de granulação 320, 600, 800 e 1200 (20 s cada) e feltro com solução diamantada 1µm por 2 min (Apêndice A1).

Os blocos foram submetidos ao teste de microdureza inicial (SH1), utilizando microdurômetro Micromet 5114 hardness tester (Buehler, Lake Bluff, IL, EUA), com penetrador tipo Knoop, carga estática de 25 g e tempo de 10 s, acoplado ao software para análise de imagem Buehler OmniMet (Buehler, Lake Bluff, EUA) (Vieira et al.⁴³, 2005). Foram realizadas cinco impressões na região central do bloco de esmalte, com espaço de 100 µm entre elas (Apêndice A2). Os blocos que apresentaram SH1 entre 320-380 KHN foram distribuídos em grupos estatisticamente homogêneos de acordo com a média de SH1 da população total de blocos e seu intervalo de confiança ($\alpha < 0,05$) nas seguintes condições de tratamento (n=12): 1) Tratamento com enxaguatório bucal formulação controle contendo todos os ingredientes, exceto o óleo essencial (controle negativo); 2) Tratamento com enxaguatório bucal contendo óleo essencial de *C. doctoris* em concentração equivalente à CIM; e 3) Tratamento com digluconato de clorexidina 0,12% (Periogard®).

Após o experimento, foi realizado um novo teste de dureza de superfície (SH2) de acordo com a metodologia descrita anteriormente. A porcentagem de perda de dureza de superfície (%SH) foi calculada de acordo com a seguinte fórmula: $\%SH = 100 \times (SH2 - SH1) / SH1$.

Crescimento e tratamento do biofilme polimicrobiano

Os blocos de esmalte foram isolados com verniz de unha, deixando apenas a superfície do esmalte exposta. Em seguida, foram posicionados verticalmente para

criar um modelo de adesão ativa (Exterkate et al.¹², 2010) e esterilizados em micro-ondas a 410 W (Viana et al.⁴², 2009) (Apêndice A3).

Para o crescimento dos biofilmes, foi utilizado um modelo de fatura-miséria desenvolvido por van de Sande et al.⁴⁰ (2011), com modificações validadas*. Os blocos foram transferidos para placas de 24 poços (Techno Plastic Products AG, Labware, Switzerland) contendo 0,4 ml do inóculo polimicrobiano (saliva). Após 1 h a temperatura ambiente, 1,8 mL do meio de cultura McBain suplementado com 0,5% de sacarose foi adicionado. Após 6 h de incubação, os blocos foram lavados por 10 s em NaCl 0,9% e transferidos para o meio McBain sem sacarose. Os tratamentos foram realizados uma vez ao dia no primeiro dia, após o período de fatura e duas vezes ao dia a partir do segundo dia de experimento, antes e após o período de fatura. Os blocos foram lavados por imersão em solução salina 0,9% antes e após a imersão em 1,8 mL da solução de tratamento por 1 min (Apêndice A4).

A acidogenicidade do biofilme foi analisada através da aferição do pH, após cada troca de meio de cultura, utilizando um eletrodo específico (2A14-JL- Analyser) acoplado a um analisador de íons (720A – Orion Research, EUA) (Apêndice A4).

Análise microbiológica do biofilme

Ao término do período experimental, os biofilmes presentes na superfície dos blocos foram removidos e analisados quanto a sua composição microbiológica.

*Nota explicativa: Foi utilizado o modelo de indução de cárie in vitro validado no Capítulo 1.

Os biofilmes foram dispersos em 2 mL de solução salina 0,9% utilizando ultrassom por 10 s (Cuba de ultrassom Cristófoli, Campo Mourão – PR, Brasil, 42 kHz). Em seguida, as amostras foram semeadas em ágar BHI (Brighenti et al.⁴, 2012), ágar MSBS (Gold et al.¹⁴, 1973), ágar Rogosa (Rogosa et al.³³, 1951) e ágar BHI pH 4,7 (Azevedo et al.², 2014), para isolamento, respectivamente, de bactérias anaeróbias totais, estreptococos do grupo mutans, lactobacilos e bactérias anaeróbias acidúricas de acordo com a metodologia previamente descrita (Apêndice A5). Os resultados foram expressos em log (1+UFC/mm²).

Análise dos dados

Os resultados da análise de micro-organismos na saliva e dos testes de CIM e CBM foram analisados descritivamente. Os demais dados foram analisados com o programa GraphPad Prism versão 3.02 (GraphPad Software Inc., San Diego, CA, USA). A porcentagem de perda de dureza de superfície (%SH) e a quantidade de micro-organismos no biofilme foram analisadas pelo teste de Kruskal-Wallis, seguido de teste post hoc de Dunn. Para a comparação da acidogenicidade dos biofilmes entre os grupos dentro de um mesmo dia de experimento e dentro da mesma condição do meio de cultura (com ou sem sacarose), foi aplicado o teste de Kruskal-Wallis, seguido de teste post hoc de Dunn. As condições com e sem sacarose, foram comparadas utilizando uma análise global de todos os dias, dentro de um mesmo grupo, através do teste de Mann Whitney. O nível de significância foi estabelecido em 5 %.

Resultados

O rendimento em massa do óleo essencial de *Croton doctoris* S. Moore foi de 0,4%.

A CIM e a CBM do óleo essencial e do CHX estão expressas na Tabela 1. Observa-se que óleo essencial possui atividade antimicrobiana contra micro-organismos em suspensões provenientes da saliva, porém em uma concentração maior que a atividade do digluconato de clorexidina 0,12%.

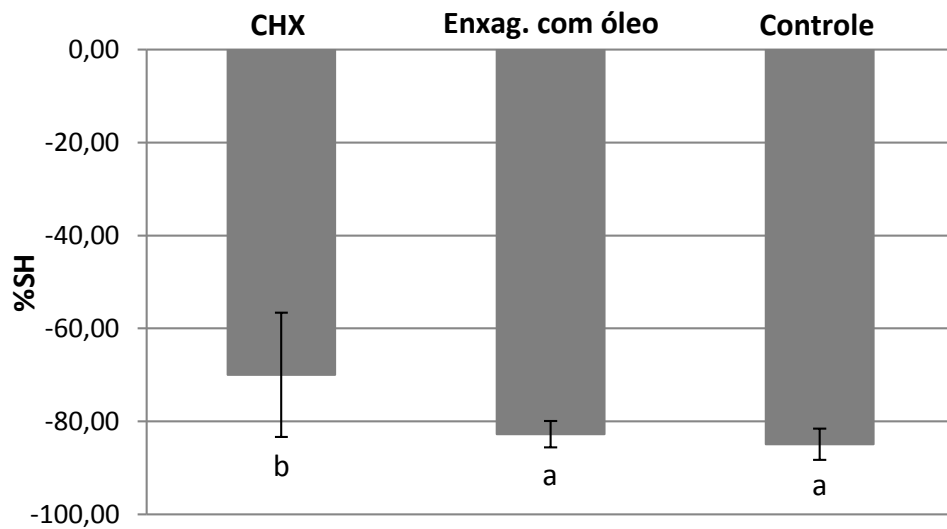
Tabela 1- Valores de CIM e CBM (%) das substâncias estudadas

	CIM (%)	CBM (%)
Óleo essencial de <i>C. doctoris</i> S. Moore (v/v)	0,625	1,250
Digluconato de clorexidina 0,12% (v/v)	0,004	0,008

A média ($\pm dp$) da concentração de micro-organismos anaeróbicos totais na saliva doada foi de $2,18 \times 10^7$ UFC/mL ($\pm 7,66 \times 10^6$), de estreptococos do grupo mutans foi de $7,38 \times 10^5$ UFC/mL ($\pm 9,55 \times 10^5$), de bactérias anaeróbicas acidúricas foi de $2,36 \times 10^5$ UFC/mL ($\pm 1,78 \times 10^5$), e de lactobacilos foi de $3,98 \times 10^4$ UFC/mL ($\pm 3,53 \times 10^4$).

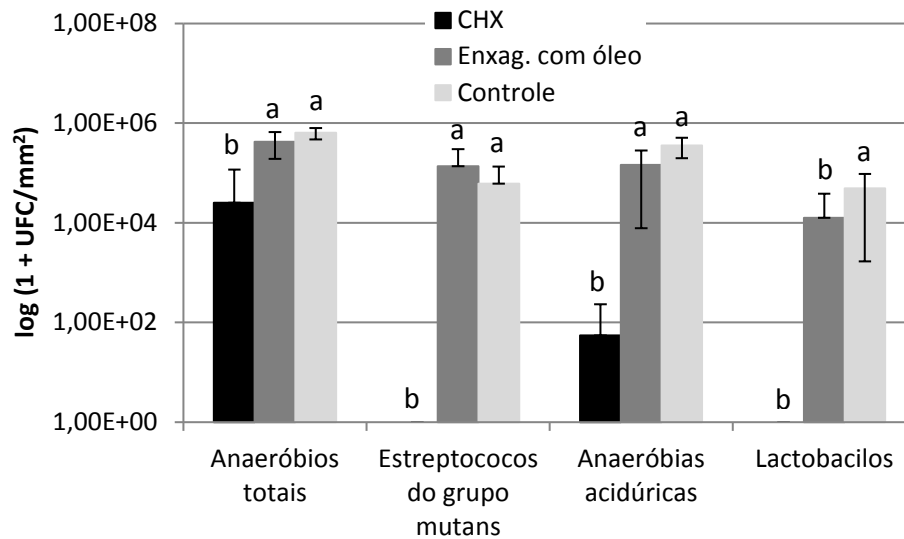
As médias das porcentagens de perda de dureza (%SH) estão apresentadas na Figura 1. Não houve uma diferença estatisticamente significativa na %SH entre os grupos enxaguatório com óleo e controle negativo ($p > 0,05$). Somente o grupo CHX foi capaz de interferir na desmineralização do esmalte, apresentando uma diferença estatística significativa quando comparada com os demais grupos ($p < 0,001$).

Figura 1- Porcentagem média \pm dp de perda de dureza de superfície (%SH) dos blocos de esmalte de acordo com o grupo de tratamento. Letras distintas demonstram diferenças estatísticas entre os grupos (teste de Kruskal-Wallis, seguido de teste post hoc de Dunn, $p < 0,05$).



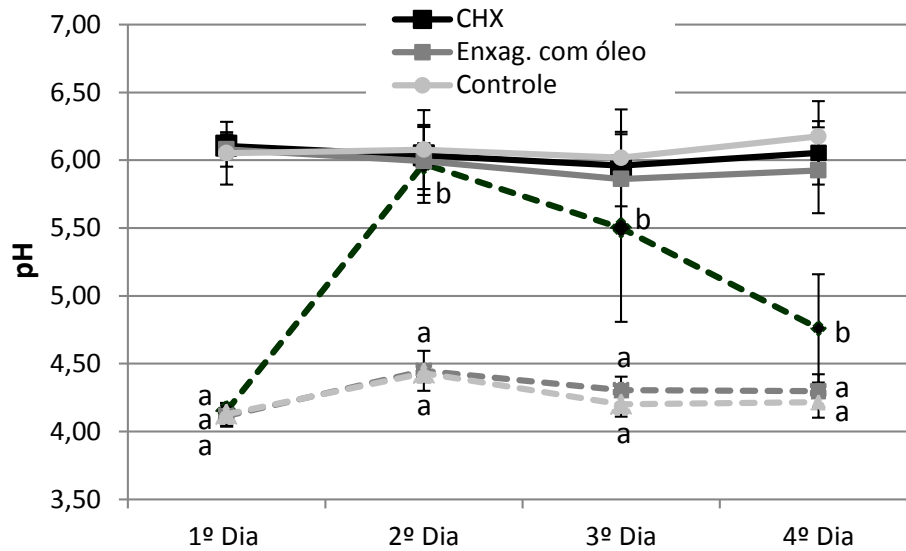
Não houve diferença estatisticamente significativa na concentração microbiana do biofilme entre os grupos controle negativo e enxaguatório com óleo essencial ($p > 0,05$), exceto para a concentração de lactobacilos ($p < 0,05$). A concentração microbiana do grupo CHX foi estatisticamente menor que o grupo controle negativo em todos os parâmetros analisados ($p < 0,001$) (Figura 2).

Figura 2- Concentração de bactérias presentes no biofilme formado nos blocos de esmalte (média \pm dp) (n=12). Letras distintas demonstram diferenças estatísticas entre os grupos (teste de Kruskal-Wallis, seguido de teste post hoc de Dunn, $p < 0,05$).



Considerando todos os dias de experimento, a acidogenicidade dos biofilmes em meio de cultura com 0,5% de sacarose foi estatisticamente maior em todos os grupos do que em meio sem sacarose ($p < 0,0001$). Dentro de um mesmo dia, a acidogenicidade dos biofilmes em meio de cultura sem sacarose foi estatisticamente semelhante entre os três grupos ($p > 0,05$) em todos os dias analisados. A acidogenicidade dos biofilmes do grupo enxaguatório com óleo em meio de cultura com 0,5% de sacarose foi semelhante à do grupo controle negativo ($p > 0,05$) em todos os dias do experimento. O grupo CHX apresentou uma acidogenicidade menor no segundo ($p < 0,001$), terceiro ($p < 0,01$) e quarto dia ($p < 0,01$) de tratamento (Figura 3).

Figura 3- Acidogenicidade (média \pm dp) dos biofilmes de acordo com o grupo de tratamento (n=12). Linhas tracejadas correspondem ao meio suplementado com sacarose e as linhas contínuas correspondem ao meio sem sacarose. Letras distintas demonstram diferenças estatísticas entre os grupos para o meio com sacarose (teste de Kruskal-Wallis, seguido de teste post hoc de Dunn e teste de Mann Whitney, $p < 0,05$). Para o meio sem sacarose, não houve diferença estatística entre os grupos (teste de Kruskal-Wallis, seguido de teste post hoc de Dunn, $p > 0,05$).



Discussão

O controle do biofilme é o fator mais importante na prevenção de lesões de cárie (Zanela et al.⁴⁹, 2002). A utilização de plantas naturais no controle da microbiota oral é uma opção terapêutica promissora, já que a clorexidina, o produto mais eficaz da atualidade, desencadeia efeitos colaterais. Plantas do gênero *Croton* são muito utilizadas pela medicina popular para o tratamento de diversas doenças (Salatino et al.³⁴, 2007), porém o seu potencial farmacológico ainda é pouco explorado.

Brighenti et al.⁵ (2014) demonstraram que o extrato hidroalcoólico de *C. doctoris* apresentou atividade antimicrobiana contra micro-organismos de interesse cariogênico. No presente estudo, o óleo essencial dessa planta apresentou atividade

antimicrobiana contra um pool de micro-organismos em suspensão, provenientes da saliva.

Vários estudos têm demonstrado a atividade antimicrobiana de óleos essenciais contra micro-organismos orais (Nascimento et al.²⁷, 2008; Cha et al.⁷, 2007; Maggi et al.¹⁸, 2010; Lang, Buchbauer.¹⁷, 2012). O óleo essencial de *C. doctoris* demonstrou ser mais ativo do que os óleos essenciais de *Hyptis pectinata* e de seis espécies de *Hypericum* (Maggi et al.¹⁸, 2010). Entretanto, a CIM do óleo essencial de *C. doctoris* foi menor do que a observada no óleo essencial de *Cryptomeria japonica* (Cha et al.⁷, 2007). É importante ressaltar que os estudos disponíveis na literatura raramente utilizam um inóculo polimicrobiano para avaliação da CIM e CBM. Em comunidade, micro-organismos possuem metabolismo e comportamento diferenciado, podendo realizar transferência de genes e são mais resistentes a antimicrobianos (Marsh²⁰, 2005). Portanto, os valores de CIM e CBM obtidos para o óleo essencial de *C. doctoris* apresenta resultados promissores.

Há poucos estudos disponíveis avaliando o efeito de produtos naturais utilizando biofilmes polimicrobianos. Em um estudo in situ, Brighenti et al.⁴, 2012, demonstraram que a %SH do extrato bruto de *Psidium cattleianum* foi em torno de 60%, enquanto que o grupo controle negativo foi de 80%. No presente estudo, tanto o produto natural em teste quanto o controle negativo tiveram %SH próximas de 80%, o que demonstra a falta de efeito antimicrobiano do enxaguatório bucal contendo óleo essencial na CIM.

O pH do biofilme exerce um papel fundamental no desenvolvimento de lesões de cárie. Quando se apresenta abaixo do valor crítico do esmalte (5,5), favorece a desmineralização do esmalte e a proliferação de bactérias com maior potencial

acidogênico e acidúrico (Takahashi, Nyvad³⁷, 2008). Em meio de cultura com sacarose, os biofilmes dos grupos controle e enxaguatório com óleo apresentaram valores de pH abaixo de 5,5 durante todo o experimento, o que refletiu em uma maior perda mineral de superfície (%SH) em comparação ao grupo CHX. A acidogenicidade nos meios de cultura com sacarose dos biofilmes tratados com CHX aumentou após o início do tratamento e foi diminuindo gradualmente ao longo do experimento, ficando abaixo do valor crítico no quarto dia. Essa observação demonstra a dificuldade da clorexidina em agir sobre biofilmes maduros (Vitkov et al.⁴⁴, 2005 e Zanata et al.⁴⁸, 2007). Entretanto, apesar do aumento da acidogenicidade ao longo do experimento, os valores de pH do grupo CHX no meio de cultura com sacarose apresentaram uma diferença significativa em comparação aos demais grupos para os dias de experimento o que refletiu em uma menor %SH do que as apresentadas pelos outros grupos.

Os valores de pH do biofilme em meio com sacarose e sem sacarose condizem com a Teoria da placa ecológica, no qual estabelece que uma mudança no ambiente, com a presença de sacarose, pode desencadear um desequilíbrio na microbiota, favorecendo o crescimento de bactérias acidúricas e acidogênicas que manterão o pH baixo através de produção de ácidos (Marsh²¹, 1994).

O enxaguatório com óleo apresentou ação significativa apenas na concentração de lactobacilos, o que não foi suficiente para diminuir a perda mineral da superfície do esmalte (%SH). Estreptococos do grupo mutans e lactobacilos são bactérias altamente acidogênicas e acidúricas, encontradas em grande quantidade em lesões de cárie (Munson et al.²⁶, 2004, Chhour et al.⁸, 2005). O aumento da concentração dessas bactérias leva à produção cada vez maior de ácidos, causando a desmineralização do esmalte. Assim, o controle dessas bactérias e de outras

espécies cariogênicas, através do uso de substâncias antimicrobianas, é importante em pacientes com dificuldade de realizar o controle mecânico do biofilme.

A redução da concentração de micro-organismos totais observada com o extrato bruto de *P. cattleianum* em um estudo in situ foi de, aproximadamente 6 logs, o que não foi observado no presente estudo. (Brighenti et al.⁴, 2012). O uso de extratos brutos apresenta a vantagem da ação sinérgica entre diferentes substâncias presentes (Martini, Eloff²², 1998). Entretanto, seu uso em formulações farmacêuticas é inviável devido ao forte odor, sabor e à sua forte coloração. A CHX foi capaz de diminuir o potencial cariogênico dos biofilmes formados através da inibição do crescimento de diversos grupos microbianos e do controle da acidogenicidade do biofilme.

Os micro-organismos presentes na saliva utilizados para a realização da CIM/CBM se encontram em suspensão, enquanto que no biofilme estão envolvidos por uma matriz extracelular, cuja estrutura física e composição dificultam a penetração de agentes antimicrobianos. Além do mais, a interação entre os micro-organismos leva a transferência e expressão de genes, causando redução da susceptibilidade a esses agentes (Wilson⁴⁶, 1996; Marsh²¹, 2005).

Alguns estudos obtiveram bons resultados na avaliação de extratos vegetais em biofilmes utilizando concentrações sub-inibitórias. Porém, esses testes foram realizados em culturas de espécie única (Prabu et al.³², 2006; Cardoso Sá et al.⁶, 2012). Esse é o primeiro estudo que avaliou uma substância natural utilizando biofilmes polimicrobianos e um modelo de adesão ativa, com o objetivo de mimetizar in vitro as condições encontradas na cavidade bucal.

No presente estudo, o ponto de partida para testes preliminares com o óleo essencial foi a concentração equivalente à CIM. Essa escolha foi realizada com base na literatura disponível (Cordeiro et al.⁹, 2006 e Farmacopéia Brasileira¹³, 1996), no baixo rendimento em massa obtido para o óleo e na falta de informações disponíveis sobre a citotoxicidade do óleo essencial. Ainda, a formulação proposta não possui álcool em sua formulação, ao contrário de outros produtos disponíveis no mercado. Estudos relatam que enxaguatórios com álcool possuem maior ação antimicrobiana que enxaguatórios sem álcool (Ennibi et al.¹¹, 2013; Anyanwu et al.¹, 2011), fato que pode ter influenciado nos resultados do grupo CHX. De acordo com Palmer et al. (2010), o controle do biofilme, que apresenta uma comunidade diversificada de micro-organismos, é estabelecido com uma concentração de antimicrobiano de 10 a 100 vezes maior que as utilizadas para inibir o crescimento de micro-organismos em forma planctônica. Assim, estudos futuros sobre a atividade do óleo essencial em concentrações mais altas contra biofilmes polimicrobianos deverão ser fundamentados no potencial citotóxico do óleo, para que não haja prejuízo para a saúde do paciente.

Conclusão

Conclui-se que o óleo essencial de *C. doctoris* possui atividade antimicrobiana contra micro-organismos provenientes da saliva, sendo um possível candidato para a elaboração de novos produtos, porém a sua concentração equivalente a CIM, quando incorporada em um enxaguatório bucal, não é suficiente para realizar o controle da microbiota cariogênica do biofilme e impedir a desmineralização do esmalte dentário.

Agradecimentos

Nossos agradecimentos ao botânico Antônio Arantes Sobrinho, ao Prof. Dr. Maximiliano Sérgio Cenci, a Profa. Dra. Áurea Cléia Botazzo Delbem, ao voluntário que doou a saliva, ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico - CNPq (444195/2014-9) e à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo – FAPESP (2013/12547-4) pelo suporte financeiro.

Referências*

1. Anyanwu OC, Baugh KK, Bennett SB, Jhonson JM, Madlock RL, Pollard NE, Chikwem JO. Comparison of the antibacterial effectiveness of alcohol-containing and non-alcohol-containing mouthwashes. *Lincoln Uni J Sci*. 2011; 2(1): 7-12.
2. Azevedo MS, van de Sande FH, Maske TT, Signori C, Romano AR, Cenci S. Correlation between the cariogenic response in biofilms generated from saliva of mother/child pairs. *Biofouling*. 2014; 30(8): 903-9.
3. Bishop CD. Antiviral activity of the essential oil of *Melaleuca alternifolia* (Maiden and Betche) Cheel (tea tree) against tobacco mosaic virus. *J Essent Oil Res*. 1995; 7(6): 641-4.
4. Brighenti FL, Elerson Gaetti-Jardim Jr., Marcelle Danelon, Gustavo Vaz Evangelista, Alberto Carlos Botazzo Delbem. Effect of *Psidium cattleianum* leaf extract on enamel demineralisation and dental biofilm composition in situ. *Arch Oral Biol*. 2012; 57(8): 1034-40.

*De acordo com o manual da FOAr/UNESP, adaptadas das normas Vancouver. Disponível no site: <http://www.foar.unesp.br/#!/biblioteca/manual>

5. Brighenti FL, Salvador MJ, Delbem ACB, Delben ACB, Oliveira MA, Soares CP, Freitas LSF, Koga-Ito CY. Systematic screening of plant extracts from the Brazilian Pantanal with antimicrobial activity against bacteria with cariogenic Relevance. *Caries Res.* 2014; 48(5): 353-60.
6. Cardoso Sá N, Cavalcante TTA, Araújo AX, dos Santos HS, Albuquerque MRJR, Bandeira PN, et al. Antimicrobial and antibiofilm action of Casbane Diterpene from *Croton napetaefolius* against oral bacteria. *Arch Oral Biol.* 2012; 57(5): 550-5.
7. Cha JD, Jeong MR, Jeong SII, Moon SE, Kil BS, Yun SII, Lee KY, Song YH: Chemical composition and antimicrobial activity of the essential oil of *Cryptomeria japonica*. *Phytother Res.* 2007; 21(3): 295-9.
8. Chhour KL, Nadkarni MA, Byun R, Martin FE, Jacques NA, Hunter N. Molecular analysis of microbial diversity in advanced caries. *J Clin Microbiol.* 2005; 43(2): 843-9.
9. Cordeiro CHG, Sacramento LVS, Corrêa MA, Pizzolitto AC, Bauab TM. Análise farmacognóstica e atividade antibacteriana de extratos vegetais empregados em formulações para higiene bucal. *Rev Bras Ciênc.* 2006; 42(3): 395-406.
10. Decreto Federal no 5.813, de 22 de junho de 2006. Política Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterapia [Internet]. [acesso em 2013 abr 13]. Disponível em http://www.planalto.gov.br/ccivil_03/_Ato2004-/2006/Decreto/D5813.htm.
11. Ennibi O, Lakhdar L, Bouziane A, Bensouda Y, Abouqal R. Chlorhexidine alcohol base mouthrinse versus chlorhexidine formaldehyde base mouthrinse efficacy on plaque control: Double blind, randomized clinical trials. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal.* 2013; 18(1): 135-9.

12. Exterkate RA, Crielaard W, ten Cate JM. Different response to amine fluoride by *Streptococcus mutans* and polymicrobial biofilms in a novel high-throughput active attachment model. *Caries Res.* 2010; 44(4): 372-9.
13. Farmacopéia Brasileira. 4th ed. São Paulo: Atheneu; 1996.
14. Gold OG, Jordan HV, Van Houte J. A selective medium for *Streptococcus mutans*. *Arch Oral Biol.* 1973; 18(11): 1357-64.
15. Jeon JC, Rosalen PL, Falsetta ML, Koo H. Natural products in caries research: current (Limited) knowledge, challenges and future perspective. *Caries Res.* 2011; 45(3): 243-63.
16. Karpouhtsis I, Pardali E, Feggou E, Kokkini S, Scouras ZG, Mavragani-Tsipidou P. Insecticidal and genotoxic activities of oregano essential oils. *J Agric Food Chem.* 1998; 46(3): 1111–5.
17. Lang G, Buchbauer G A review on recent research results (2008–2010) on essential oils as antimicrobials and antifungals. *Rev Flavour Fragr J.* 2012; 27(Suppl 1): 13-39.
18. Maggi F, Cacchini C, Cresci A, Coman MM, Tirillini B, Sagratini G, Papa F, Vittori S. Chemical composition and antimicrobial activity of the essential oil from several *Hypericum* Taxa (Guttiferae) growing in central Italy (Appennino Umbro-Marchigiano). *Chem Nat Compd.* 2010; 1(Suppl 46): 125-9.
19. Mari M, Bertolini P, Pratella GC. Non-conventional methods for the control of post-harvest pear diseases. *J Appl Microbiol.* 2003; 94: 761-6.

20. Marsh. Dental plaque: biological significance of a biofilm and community life-style. *J Clin Periodontol.* 2005; 32 (Suppl 6): 7-15.
21. Marsh PD. Microbial ecology of dental plaque and its significance in health and disease. *Adv Dent Res.* 1994; 8(2): 263-71.
22. Martini N, Eloff JN. The preliminary isolation of several antibacterial compounds from *Combretum erythrophyllum* (Combretaceae). *J Ethnopharmacol.* 1998; 62(3): 255-63.
23. McBain AJ, Sissons C, Ledder RG, Sreenivasan PK, De Vizio W, Gilbert P. Development and characterization of a simple perfused oral microcosm. *J Appl Microbiol.* 2005; 98(3): 624-34.
24. Montanari RM. Composição química e atividades biológicas dos óleos essenciais de espécies de Anacardiaceae, Siparunaceae e Verbenaceae. [Dissertação de mestrado]. Viçosa: Universidade Federal de Viçosa; 2010.
25. Mourey A, Canillac N. Anti-*Listeria monocytogenes* activity of essential oils components of conifers. *Food Control.* 2002; 13: 289-92.
26. Munson MA, Banerjee A, Watson TF, Wade WG. Molecular analysis of the microflora associated with dental caries. *J Clin Microbiol.* 2004; 42(7): 3023-9.
27. Nascimento PFC, Alviano WS, Nascimento ALC, Santos PO, Arrigoni-Blank MF, Jesus RA, Azevedo VG, Alviano DS, Bolognese AM, Trindade RC. *Hyptis pectinata* essential oil: chemical composition and anti-*Streptococcus mutans* activity. *Oral Dis* 2008, 14(6): 485-9.

28. Palmer Jr RJ. Supragingival and subgingival plaque: paradigm of biofilms. *Compend Contin Educ Dent*. 2010; 31(2): 104-6
29. Pereira MSV, Pereira JV, Albuquerque ACL, Araújo CRF, Diniz DN, Macêdo-Costa MR, et al. Plantas medicinais na odontologia: potencial antimicrobiano. João Pessoa: EDUEPB; 2010. 157p.
30. Pessoa LM, Morais SM, Bevilaqua CML, Luciano JHS. Anthelmintic activity of essential oil of *Ocimum gratissimum* Linn. And eugenol against *Haemonchus contortus*. *Vet Parasitol*. 2002; 109(1-2): 59-63.
31. Pinto VG. Saúde bucal coletiva. 4th ed. São Paulo: Santos; 2000.
32. Prabu GR, Gnanamani A, Sadulla S. Guaijaverin - a plant flavonoid as potential antiplaque agent against *Streptococcus mutans*. *J Appl Microbiol*. 2006; 101(2): 487-95.
33. Rogosa M, Mitchell JA, Wiseman RF. A selective medium for the isolation and enumeration of oral fecal lactobacilli. *J Bact*. 1951; 62: 132.
34. Salatino A, Salatino MLF, Negri G. Traditional uses, chemistry and pharmacology of *Croton* species (Euphorbiaceae). *Braz Chem Soc*. 2007; 18(1): 11-33.
35. Siqui AC, Sampaio, ALF, Sousa MC, Henriques MGMO, Ramos, MFS. Óleos essenciais – potencial antiinflamatório. *Biotechnologia cien desenvol*. 2000; 16: 38-43.
36. Sissons CH. Artificial dental plaque biofilm model system. *Adv Dent Res*. 1997; 11(1): 110-26.
37. Takahashi N, Nyvad B. Caries ecology revisited: microbial dynamics and the caries process. *Caries Res*. 2008; 42(6): 409-18.

38. Tisserand R, Balacs T. Essential oil safety: a guide for health care professionals. 2nd ed. London: Churchill Livingstone; 1999.
39. Torres CRG. Agentes antimicrobianos e seu potencial de uso na Odontologia. PGR: Pós-Grad Rev Fac Odontol. 2000; 3(2): 43-52.
40. van de Sande FH, Azevedo MS, Lund RG, Huysmans MC, Cenci MS. An in vitro biofilm model for enamel demineralization and antimicrobial dose-response studies. Biofouling. 2011; 27(9): 1057-63.
41. Van Strydonck DA, Timmerman MF, van der Velden U, van der Weijden GA. Plaque inhibition of two commercially available chlorhexidine mouthrinses. J Clin Periodontol. 2005; 32(3): 305-9.
42. Viana PGS. Esterilização de esmalte bovino por meio de irradiação por microondas. Efeito sobre a microdureza superficial e resistência à desmineralização [dissertação de mestrado]. Araraquara: Faculdade de Odontologia da Unesp; 2009.
43. Vieira AE, Delbem AC, Sasaki KT, Rodrigues E, Cury JA, Cunha RF. Fluoride dose response in pH-cycling models using bovine enamel. Caries Res. 2005; 39(6): 514-20.
44. Vitkov L, Hermann A, Krautgartner WD, Hermann M, Fuchs K, Klappacher M, Hanning M. Chlorhexidine-induced ultrastructural alterations in oral biofilm. Microsc Res Tech. 2005; 68(2): 85-9.
45. Wikén Albertsson K, Persson A, van Dijken JW. Effect of essential oils containing and alcohol-free chlorhexidine mouthrinses on cariogenic micro-organisms in human saliva. Acta Odontol Scand. 2013; 71(3-4): 883-91.

46. Wilson M. Susceptibility of oral bacterial biofilms to antimicrobial agents. *J Med Microbiol.* 1996; 44(2):79-87.
47. World Health Organization [Internet]. Current oral health situation at global level. cWHO 2010 [acesso em 2010 jul 30]. Disponível em www.who.int/oral_health/policy/en.
48. Zanatta FB, Rosing CK. Clorexidina: mecanismo de ação e evidências atuais de sua eficácia no contexto do biofilmesupragengival. *Scientific-A.* 2007; 1: 35-43.
49. Zanela NLM, Bijella MFTB, Rosa OPS. The influence of mouthrinses with antimicrobial solutions on the inhibition of dental plaque and on the levels of mutans streptococci in children. *Pesqui Odontol Bras.* 2002; 16(2): 101-6.

CONCLUSÃO

Conclui-se que o regime cariogênico com o uso de 0,5% de sacarose durante quatro dias, com a manutenção da saliva após a inoculação inicial e a realização de duas exposições diárias às soluções de tratamento, iniciando-se após o crescimento inicial do biofilme por 6h, sem o uso de solução neutralizadora é o ideal para ser utilizado em testes de atividade antimicrobiana. Através desse modelo verificou-se que o óleo essencial de *C. doctoris* possui atividade antimicrobiana contra microorganismos provenientes da saliva, porém sua concentração equivalente à CIM, quando incorporação em uma formulação de enxaguatório, não é eficaz para realizar o controle de biofilmes polimicrobianos e de impedir a desmineralização do esmalte dentário.

REFERÊNCIAS*

1. Alves D, Costab AL, Almeida RF, Carvalho JFC, Felino A. Cloreto de cetilpiridínio - revisão da literatura. Rev Port Estomatol Med Dent Cir Maxilofac. 2012; 53(3): 181-9.
2. Boneta AE, Aguilar MM, Romeu FL, Stewart B, DeVizio W, Proskin HM. Comparative investigation of the efficacy of triclosan/copolymer/sodium fluoride and stannous fluoride/sodium hexametaphosphate/zinc lactate dentifrices for the control of established supragingival plaque and gingivitis in a six-month clinical study. J Clin Dent. 2010; 21(4): 117-23.
3. Carlin V, Matsumoto MA, Saraiva PP, Artioli A, Oshima CT, Ribeiro DA. Cytogenetic damage induced by mouthrinses formulations in vivo and in vitro. Clin Oral Investig. 2012; 16(3): 813-20.
4. Castro RD, Oliveira JA, Vasconcelos LC, Maciel PP, Brasil VLM. Brazilian scientific production on herbal medicines used in dentistry. Rev Bras PI Med. 2014; 16(3): 618-27.
5. Costa X, Laguna E, Herrera D, Serrano J, Alonso B, Sanz M. Efficacy of a new mouth rinse formulation based on 0.07% cetylpyridinium chloride in the control of plaque and gingivitis: a 6-month randomized clinical trial. J Clin Periodontol. 2013; 40(11): 1007-15.
6. Cury JA. Controle químico da placa dental. 2nd ed. São Paulo: Artes Médicas; 1997.

*De acordo com o manual da FOAr/UNESP, adaptadas das normas Vancouver. Disponível no site: <http://www.foar.unesp.br/#!/biblioteca/manual>

7. Decreto Federal no 5.813, de 22 de junho de 2006. Política Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterapia [Internet]. [acesso em 2013 abr 13]. Disponível em http://www.planalto.gov.br/ccivil_03/_Ato2004-/2006/Decreto/D5813.htm.
8. Eley BM. Antibacterial agents in the control of supragingival plaque - a review. *Br Dent J.* 1999; 186(6): 286-96.
9. Faria G, Cardoso CR, Larson RE, Silva JS, Rossi MA. Chlorhexidine-induced apoptosis or necrosis in L929 fibroblasts: a role for endoplasmic reticulum stress. *Toxicol Appl Pharmacol.* 2009; 234(2): 256-65.
10. Fejerskov O, Kidd E. Cárie dentária. A doença e seu tratamento clínico. 2nd ed. São Paulo: Santos; 2008.
11. Hidalgo E, Dominguez C. Mechanisms underlying chlorhexidine-induced cytotoxicity. *Toxicol In Vitro.* 2001; 15(4-5): 271-6.
12. Keyes PH. The infectious and transmissible nature of experimental dental caries. Findings and implications. *Arch Oral Biol.* 1960; 1(4): 304-20.
13. Lachenmeier DW. Safety evaluation of topical applications of ethanol on the skin and inside the oral cavity. *J Occup Med Toxicol.* 2008; 13(3): 26.
14. Manji F, Fejerskov O. Dental caries in developing countries in relation to the appropriate use of fluoride. *J Dent Res.* 1990; 69(Spec): 733-41.
15. Mankodi S, Bauroth K, Witt JJ, Bsoul S, He T, Gibb R, Dunavent J, Hamilton A. A 6-month clinical trial to study the effects of a cetylpyridinium chloride mouthrinse on gingivitis and plaque. *Am J Dent.* 2005; 18 (Spec): 9A-14A.

16. Marsh PD. Microbial ecology of dental plaque and its significance in health and disease. *Adv Dent Res*. 1994; 8(2): 263–71.
17. McClure FF, Hewitt WL. The relation of penicillin to induce rat dental caries and oral *Lactobacillus acidophilus*. *J Dent Res* 1946; 25(6): 441-3.
18. McCullough MJ, Farah CS. The role of alcohol in oral carcinogenesis with particular reference to alcoholcontaining mouthwashes. *Aust Dent J*. 2008; 53(4): 302-6.
19. Miller WD. The microorganisms of the human mouth: the local and general disease wich are caused by them. Philadelphia: White Dental; 1980.
20. Ministério da Saúde (Brasil), Secretaria de Ciência, Tecnologia e Insumos Estratégicos Departamento de Assistência Farmacêutica. Política Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápico. Brasília: Ministério da Saúde; 2006.
21. Newbrum E. Cariologia. São Paulo: Santos; 1988.
22. Orland FJ, Blayney JR, Harrison RW, Reyniers JA, Trexler PC, Wagner M et al. Use of the germfree animal technic in the study of experimental dental caries: I. basic observations on rats reared free of all microorganisms. *J Dent Res*. 1954; 33(2): 147-74.
23. Paraskevas S. Randomized controlled clinical trials on agents used for chemical plaque control. *Int J Dent Hyg*. 2005; 3(4): 162-78.
24. Pitten FA, Kramer A. Efficacy of cetylpyridinium chloride used as oropharyngeal antiseptic. *Arzneimittelforschung*. 2001; 51(7): 588-95.

25. Ribeiro LG, Hashizume LN, Maltz M. The effect of different formulations of chlorhexidine in reducing levels of mutans streptococci in the oral cavity: a systematic review of the literature. *J Dent.* 2007; 35(5): 359-70.
26. Roberts WR, Addy M. Comparison of the in vivo and in vitro antibacterial properties of antiseptic mouthrinses containing chlorhexidine, alexidine, cetyl pyridinium chloride and hexetidine. Relevance to mode of action. *J Clin Periodontol.* 1981; 8(4): 295-310.
27. Roldán S, Herrera D, Santa-Cruz I, O'Connor A, González I, Sanz M. Comparative effects of different chlorhexidine mouth-rinse formulations on volatile sulphur compounds and salivary bacterial counts. *J Clin Periodontol.* 2004; 31(12): 1128-34.
28. Schaeken MJM, van der Hoeven JS, Saxen CA, Cummins D. The effect of mouth rinses containing zinc and triclosan on plaque accumulation, development of gingivitis and formation of calculus in a 28-week clinical test. *J Clin Periodontol.* 1996; 23(5): 465-70.
29. Sissons CH. Artificial dental plaque biofilm model system. *Adv Dent Res.* 1997; 11(1): 110-26.
30. Slot DE, Wiggelinkhuizen L, Rosema NA, Van der Weijden GA. The efficacy of manual toothbrushes following a brushing exercise: a systematic review. *Int J Dent Hyg.* 2012; 10(3): 187-97.
31. Tabenski L, Maisch T, Santarelli F, Hiller KA, Schmalz G. Individual growth detection of bacterial species in an in vitro oral polymicrobial biofilm model. *Arch Microbiol.* 2014; 196(11): 819-28.

32. Takahashi N, Nyvad B. Caries ecology revisited: microbial dynamics and the caries process. *Caries Res.* 2008; 42(6): 409-18.
33. ten Cate JM. The need for antibacterial approaches to improve caries control. *Adv Dent Res.* 2009; 21(1): 8-12.
34. Vitkov L, Hermann A, Krautgartner WD, Hermann M, Fuchs K, Klappacher M, et al. Chlorhexidine-induced ultrastructural alterations in oral biofilm. *Microsc Res Tech.* 2005; 68(2): 85-9.
35. Torres CRG. Agentes antimicrobianos e seu potencial uso na Odontologia. *PGR: Pós-Grad Rev Fac Odontol.* 2000; 3(2): 43-52.
36. Van Strydonck DA, Timmerman MF, van der Velden U, van der Weijden GA. Plaque inhibition of two commercially available chlorhexidine mouthrinses. *J Clin Periodontol.* 2005; 32(3): 305-9.
37. Van Leeuwen M, Rosema N, Versteeg P, Slot D, Van Winkelhoff A, Van der Weijden G. Long-term efficacy of a 0.07% cetylpyridinium chloride mouth rinse in relation to plaque and gingivitis: a 6-month randomized, vehicle-controlled clinical trial. *Int J Dent Hyg.* 2015; 13 (2): 93-103.
38. White DJ. An alcohol-free therapeutic mouthrinse with cetylpyridinium chloride (CPC)--the latest advance in preventive care: Crest Pro-Health Rinse. *Am J Dent.* 2005; 18(Spec): 3A-8A.
39. Zanata FB, Antoniazzi RP, Rosing CK. The effect of 0.12% chlorhexidine gluconate rinsing on previously plaque-free and plaque-covered surfaces: a randomized, controlled clinical trial. *J Periodontol.* 2007; 78(11): 2127-34.

40. Zanela NLM, Bijella MFTB, Rosa OPS. The influence of mouthrinses with antimicrobial solutions on the inhibition of dental plaque and on the levels of mutans streptococci in children. *Pesqui Odontol Bras.* 2002; 16(2): 101-6.

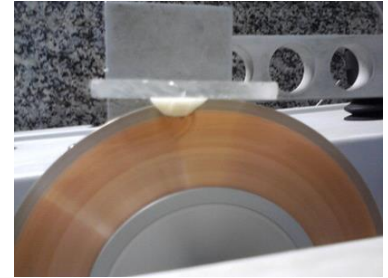
APÊNDICE A1- Preparo e polimento dos blocos de esmalte. A- Coroa de dente bovino; B- Separação das porções vestibular e lingual da coroa; C- Secção da face vestibular utilizando-se discos diamantados; D- Bloco de esmalte obtido; E- Bloco de esmalte encerado em base de acrílico; F- Bases inseridas na peça de encaixe da Politriz para planificação da dentina e posterior polimento do esmalte; G- Politriz.



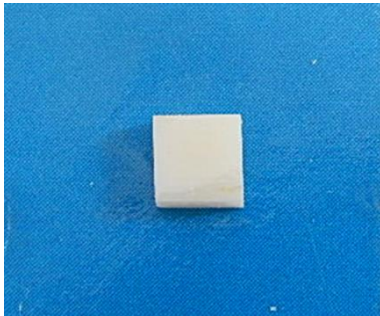
A



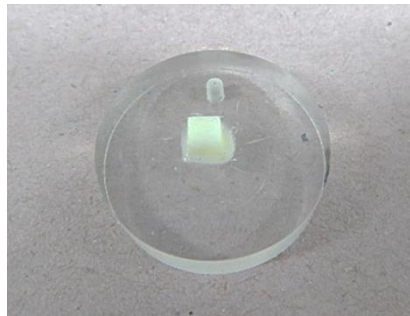
B



C



D

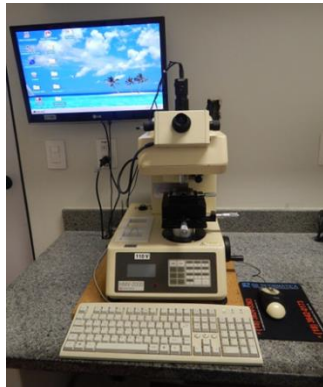


E

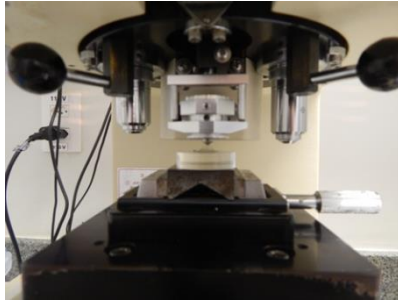


G

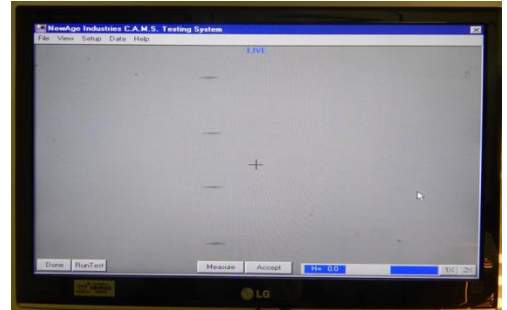
APÊNDICE A2- Teste de dureza nos blocos de esmalte. A- microdurômetro Micromet 5114 Hardness Tester com penetrador tipo Knoop, acoplado ao software para análise de imagem. B- Base com bloco de esmalte posicionado para análise da dureza através da realização de impressões. C- Impressões realizadas nos blocos.



A

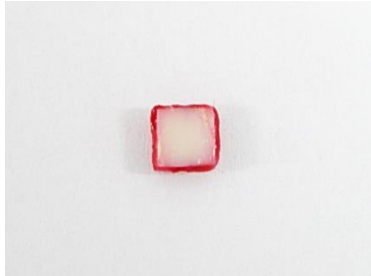


B

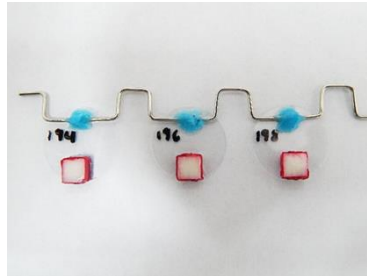


C

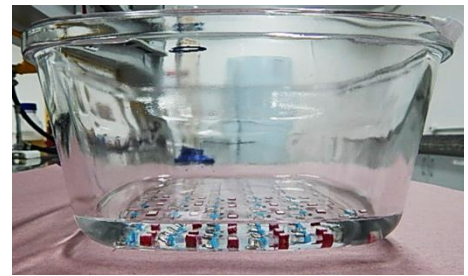
APÊNDICE A3- Isolamento e esterilização dos blocos de esmalte. A- bloco isolado com esmalte de unha; B- Blocos suspensos verticalmente; C- Blocos inseridos em um recipiente com água destilada para a esterilização; D- Tempo e potência utilizados para a esterilização em micro-ondas; E- Micro-ondas.



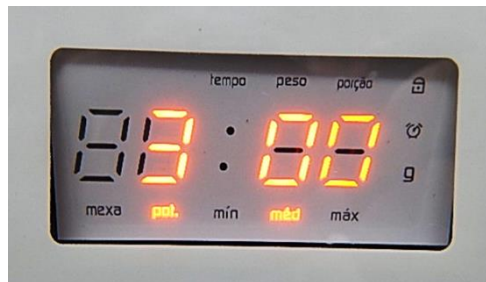
A



B



C



D



E

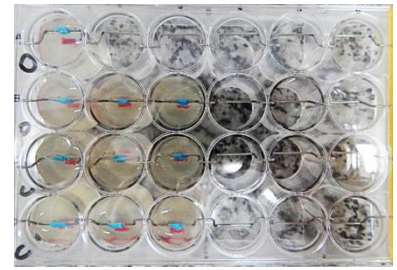
APÊNDICE A4- Primeiro dia de tratamento. A- Saliva coletada em gelo; B- inoculação de saliva sobre a superfície de esmalte dos blocos após ser solubilizada; C- Adição do meio de cultura McBain com 0,5% de sacarose; D- Placa de 24 poços em jarra com gerador de anaerobiose; E- Lavagem dos blocos em NaCl 0,9; F- Tratamento dos blocos; G- Lavagem dos blocos em NaCl 0,9%; H- Blocos de esmalte em meio MacBain sem sacarose. I- Aferição da acidogenicidade do biofilme.



A



B



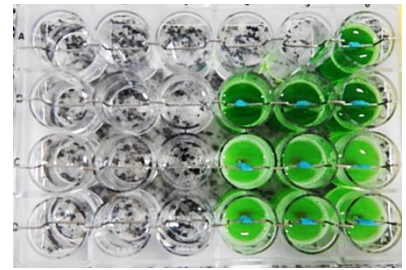
C



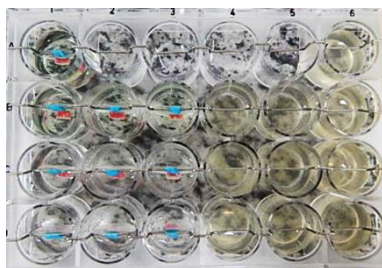
D



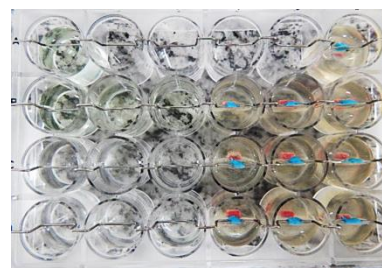
E



F



G

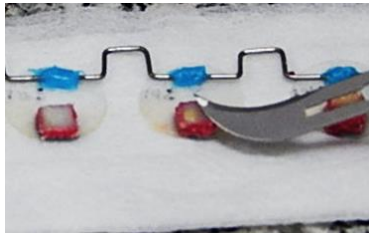


H



I

APÊNDICE A5- Análise microbiológica dos biofilmes. A- Remoção do biofilme formado na superfície de esmalte com o auxílio de uma lâmina de bisturi; B- Solubilização do biofilme em NaCl 0,9%; C- Submissão ao ultrassom; D- Crescimento de bactérias anaeróbias totais em ágar BHI, de estreptococos do grupo mutans em ágar MSBS, de bactérias acidúricas em ágar BHI pH 4.7 e de lactobacilos em ágar Rogosa.



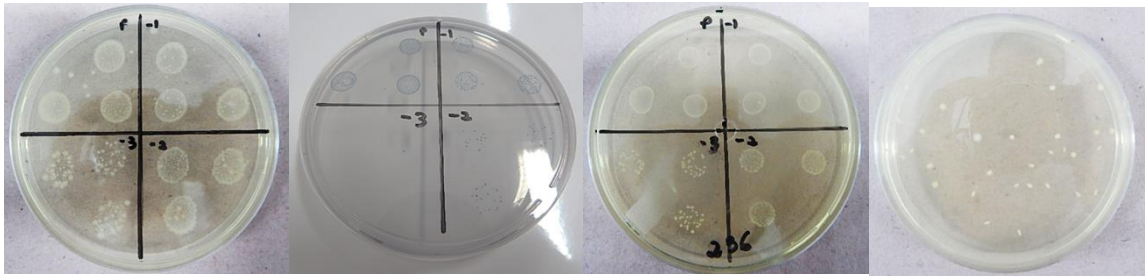
A



B



C



D

ANEXO 1 – Parecer do Comitê de Ética em Pesquisa em Seres Humanos

FACULDADE DE
ODONTOLOGIA DE
ARARAQUARA - UNESP



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: Avaliação da atividade antimicrobiana, caracterização do perfil químico e teste de formulação farmacêutica experimental contendo óleo essencial

Pesquisador: Fernanda Lourenção Brighenti

Área Temática:

Versão: 2

CAAE: 17061313.6.0000.5416

Instituição Proponente: Faculdade de Odontologia de Araraquara - UNESP

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 405.841

Data da Relatoria: 17/09/2013

Apresentação do Projeto:

O projeto em questão trabalha com o estudo do uso de óleo essencial de *Croton doctoris* S. Moore como possível nova fonte de agente terapêutico antimicrobiano e anticariogênico. Também pretende identificar os agentes majoritários deste óleo e formular e desenvolver enxaguatório bucal a base deste óleo essencial.

Objetivo da Pesquisa:

O objetivo desse trabalho será avaliar a atividade antimicrobiana, a composição química e desenvolver um enxaguatório bucal a base de óleo essencial de *C. doctoris*, avaliando: 1) Os componentes majoritários do óleo essencial; 2) A atividade antimicrobiana do óleo essencial contra biofilme polimicrobiano compostos por micro-organismos provenientes da saliva e 3) A capacidade do enxaguatório em impedir a desmineralização do esmalte e a composição microbiológica e bioquímica do biofilme utilizando um modelo para indução de cárie *in vitro*.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Descrição dos riscos associados à Pesquisa

O processo de obtenção do óleo essencial utilizará apenas água e um aparelho para destilação. Para produção em pequena escala, é preconizado o aparelho do tipo Clevenger com modificações (Farmacopêta Brasileira, 1996). Esse aparelho é constituído por um balão de fundo

Endereço: HUMAITÁ 1580

Bairro: CENTRO

CEP: 14.801-903

UF: SP

Município: ARARAQUARA

Telefone: 1833-0184

Fax: 1833-0184

E-mail: cep@foar.unesp.br, mmele@foar.unesp.br

FACULDADE DE
ODONTOLOGIA DE
ARARAQUARA - UNESP



Continuação do Parecer: 405.041

redondo (frasco de destilação), onde serão adicionados 400 g de folhas frescas e 1L de água (Figura 1). Essa solução será então aquecida a 50°C sob pressão reduzida, para que a destilação ocorra a uma temperatura abaixo do ponto de ebulição da água, o que torna o processo mais seguro para o pesquisador e mantém a estabilidade dos compostos voláteis. As folhas estarão em contato direto com a água que, ao entrar em ebulição, arrasta consigo as substâncias voláteis das folhas.

Observa-se, então, que o processo de obtenção do óleo essencial é muito simples e de baixo custo. O risco existente para os pesquisadores é se queimarem com o vapor da destilação ou com a manta aquecedora. Para minimizar esse risco, os pesquisadores receberão treinamento de um técnico capacitado para uso do equipamento, será utilizada vidraria de boa procedência, em bom estado de conservação e uma baixa temperatura da manta aquecedora (50°C).

Em seguida, o óleo será separado da água através do uso de sulfato de sódio anidro. A classificação NFPA 704 dessa substância é apresentada na Figura 2. Observa-se que o risco à saúde oferecido por essa substância é muito pequena, sendo o mesmo que da acetona ou do cloreto de sódio e sua inflamabilidade e instabilidade são também mínimas, iguais às da água. Para minimizar o risco de irritabilidade oferecido pela substância, os pesquisadores utilizarão EPI durante sua manipulação (equipamento de proteção ocular testado e aprovado de acordo com as normas governamentais adequadas, luvas que deverão ser retiradas sem contato com a superfície externa, avental de manga longa com punho e máscara) e as mãos deverão ser lavadas após seu uso. Além disso, o produto será manipulado em local ventilado e armazenado com o recipiente hermeticamente fechado em lugar seco e bem ventilado. Nenhum componente deste produto presente em concentrações maiores ou iguais a 0,1% é identificado como carcinogênico provável, possível ou confirmado pelo IARC (Sigma-Aldrich, 2013). A Faculdade de Odontologia - campus de Araraquara possui um programa de descarte de resíduos químicos e, por esse motivo, a substância não será descartada no esgoto.

Estudos realizados anteriormente (Processos FAPESP 2008/04114-2 e 08/53299-5) demonstraram a baixa toxicidade do extrato de folhas de *C. doctoris* tanto *In vitro*, através do ensaio de MTT, quanto *In vivo*, através de estudo histopatológico da aplicação do extrato na mucosa de ratos. No ensaio de MTT, foi demonstrado que a função mitocondrial das células tratadas com concentrações de até duas vezes maiores que a concentração inibitória mínima é estatisticamente maior do que o controle positivo (látex) (ANOVA, $p < 0,05$). A toxicidade *In vivo* foi analisada por

Endereço: HUMAITA 1680
Bairro: CENTRO CEP: 14.801-903
UF: SP Município: ARARAQUARA
Telefone: 1633-0164 Fax: 1633-0164 E-mail: cep@foar.unesp.br; mnagle@foar.unesp.br

FACULDADE DE
ODONTOLOGIA DE
ARARAQUARA - UNESP



Continuação do Parecer: 405.541

um período de até 45 dias e todos os órgãos estudados (coração, fígado, Intestino delgado, Intestino grosso, esôfago, estômago, pulmão, baço e rins) apresentaram aspectos de normalidade. Na mucosa oral, o grupo do extrato de *C. doctoris* apresentou um pequeno aumento no número de fibroblastos na lâmina própria, mas não foram encontradas células atípicas. Entretanto, as alterações encontradas não evidenciam a existência de toxicidade, pois elas foram bem diferentes das anormalidades observadas para o grupo controle positivo (lauril sulfato de sódio 50% p/p). Desse modo, há evidências de que a manipulação das folhas de *C. doctoris* não será tóxica para os pesquisadores. Entretanto, caso a eficácia do enxaguatório seja comprovada, estudo futuro de citotoxicidade deve ser realizado com o produto proposto.

Descrição dos riscos inerentes da publicação dos resultados finais junto a população

Existe o risco de que a população, ao ter acesso aos resultados finais, passe a utilizar a planta para tratamento de problemas dentários. Para evitar esse risco, será acrescentado ao relatório final um esclarecimento à população de que o produto ainda não está disponível para uso, de que extratos da planta ainda não devem ser utilizados para tratamento de problemas dentários e que o uso de qualquer formulação para uso oral só deve ser realizado com orientação de um cirurgião dentista.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

A pesquisadora descreveu, em detalhes, os riscos envolvidos na realização da pesquisa. O relator considerou apropriado e digno de divulgação como "modelo" de descrição de riscos em um projeto de pesquisa. Sendo portanto considerado "aprovado".

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Os pesquisadores enviaram todos os termos de apresentação obrigatória.

Recomendações:

Todas as recomendações foram atendidas.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Aprovado

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

Endereço: HUMAITA 1680
 Bairro: CENTRO CEP: 14.801-903
 UF: SP Município: ARARAQUARA
 Telefone: 1633-0164 Fax: 1633-0164 E-mail: cep@foar.unesp.br; mriagle@foar.unesp.br

FACULDADE DE
ODONTOLOGIA DE
ARARAQUARA - UNESP



Continuação do Parecer: 405.541

Considerações Finais a critério do CEP:
Projeto APROVADO em sessão de 24 de setembro de 2013.

ARARAQUARA, 25 de Setembro de 2013

Assinador por:
Maurício Melrelles Nagle
(Coordenador)

Endereço: HUMAITÁ 1880
Bairro: CENTRO CEP: 14.801-903
UF: SP Município: ARARAQUARA
Telefone: 1633-0164 Fax: 1633-0164 E-mail: cep@fow.unesp.br, mnagle@fow.unesp.br

ANEXO 2 – Parecer da Comissão de Ética no Uso de Animais - CEUA



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"
Câmpus de Araraquara
FACULDADE DE ODONTOLOGIA



Proc. CEUA nº 28/2013

Araraquara, 18 de março de 2014.

Senhores Pesquisadores:

A Comissão de Ética no Uso de Animal - CEUA desta Faculdade, em reunião hoje realizada, após a avaliação do projeto de sua responsabilidade intitulado "*AValiação DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA E TESTE DE FORMULAÇÃO FARMACÊUTICA EXPERIMENTAL CONTENDO ÓLEO ESSENCIAL DE CROTON DOCTORIS S. MOORE*" (Proc. CEUA nº 28/2013) AUTORIZA a realização da pesquisa, ficando a apresentação do RELATÓRIO FINAL para MARÇO/2015.

Atenciosamente.

Prof. Dr. PAULO SÉRGIO CERRI
Coordenador da CEUA

À
Profa. Dra. FERNANDA LOURENÇÃO BRIGHENTI
DD. Pesquisadora Responsável
a/c – Yasmin Etienne Albuquerque
Departamento de Clínica Infantil

Não autorizo a reprodução deste trabalho até 12/03/2017

(Direitos de publicação reservado ao autor)

Araraquara, 12 de março de 2015.

YASMIN ETIENNE ALBUQUERQUE