



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”

Walter Ariel Curti

**Avaliação do efeito antibiofilme de um enxaguatório bucal
contendo extrato da casca de romã (*Punica granatum*),
trimetafosfato de sódio e flúor**

Araçatuba – SP
2020

Walter Ariel Curti

**Avaliação do efeito antibiofilme de um enxaguatório bucal
contendo extrato da casca de romã (*Punica granatum*),
trimetafosfato de sódio e flúor**

*Trabalho de Conclusão de Curso
apresentado à Faculdade de Odontologia
de Araçatuba da Universidade Estadual
Paulista “Júlio de Mesquita Filho” –
UNESP, como parte dos requisitos para a
obtenção do título de Cirurgião-dentista.*

*Orientador: Prof^ª. Dr^ª. Debora de Barros
Barbosa*

Dedicatória

Dedico esse trabalho à minha mãe Sandra e minha Avó Olinda (in memoriam) por jamais permitirem desistir, darem forças mesmo quando achava que não conseguiria ir adiante. Obrigado por fazerem o possível e o impossível por mim e tornarem meu sonho realidade.

Agradecimientos

À Faculdade de Odontologia de Araçatuba - UNESP

*Na pessoa de seu diretor **Prof. Tit. Glauco Issamu Miyahara**, pela oportunidade de aprendizado e crescimento pessoal e profissional.*

À Prof^a. Dr^a. Debora Barros Barbosa

Por toda a orientação, paciência, carinho e respeito com que me proporcionou durante todo esse tempo. Pelo amor ao que faz, ensinar, sempre muito alegre em dividir o conhecimento conosco. Dedicada ao seu trabalho, uma professora que cativa seus alunos, os fortalece e prepara para enfrentar as próximas etapas da vida com toda a paixão da alma. Professora, a senhora me ensinou muito e espero manter todos esses ensinamentos ao longo da vida, evoluindo a cada dia mais.

Aos meus amigos de faculdade

Pela amizade durante esses anos, por toda ajuda e convivência e por todos os momentos que estiveram ao meu lado me apoiando, em especial aos irmãos de moradia, por tudo que vivemos juntos.

Às queridas Pós-graduandas Ana Paula e Gabriela

Por toda ajuda ao longo desse tempo e pela alegria de termos trabalhados juntos. Obrigada pelo carinho, pelos ensinamentos, pela compreensão.

Ao servidor técnico Jander

Por todos os ensinamentos em laboratório, clínica e na vida, por sua paciência, dedicação e bom humor. Obrigado por esses anos de convívio.

Muito obrigado!

Epígrafe

“Não há nada fixo nem permanente. Estamos em constante transformação.”

Monja Coen

Walter Ariel Curti

Curti, W, A. Avaliação do efeito antibiofilme de um enxaguatório bucal contendo extrato da casca de romã (*Punica granatum*), trimetafosfato de sódio e flúor. 2020. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Odontologia) - Faculdade de Odontologia de Araçatuba, Universidade Estadual Paulista, Araçatuba 2020.

RESUMO

O presente estudo avaliou a ação de formulações não alcoólicas para enxaguatório bucal contendo extrato da casca da romã (*Punica granatum*) (E), trimetafosfato de sódio (T) e flúor (F) contra biofilmes formados por *Candida albicans* e *Streptococcus mutans*, e sua ação sobre o pH destes biofilmes. O extrato foi obtido da casca desidratada da romã (E) por meio do processo de filtração e maceração, sendo utilizado a uma concentração de 3% nas formulações. Já as concentrações de T e F foram de 0,3% e 225 ppm nas formulações. Os grupos de formulações avaliados foram: - ETF (contendo todos os ativos), TF (contendo somente T e F) e E (formulação somente com extrato da casca de romã). Como controles utilizou-se Listerine® (C⁺) também livre de álcool e com concentração de flúor de 220 ppm, e solução salina (C⁻). Os biofilmes duplos de *Candida albicans* (ATCC 10231) e *Streptococcus mutans* (ATCC 25175) foram crescidos por 24 horas sobre a superfície de discos de hidroxiapatita previamente tratados por 1 minuto com cada uma das formulações. Os biofilmes de 24 horas foram tratados novamente por 1 ou 10 minutos após a sua formação, e as células viáveis dos biofilmes foram quantificadas. Os dados foram submetidos ao teste de normalidade (Shapiro-Wilk), seguido de ANOVA de um fator e o teste de comparação múltipla de Holm-Sidak, todos com nível de significância de 1%. Todas as formulações reduziram estatisticamente ($p < 0,01$) o biofilme de *C. albicans* e *S. mutans* em relação ao controle negativo, e as maiores reduções ocorreram com o Listerine, independentemente do tempo de tratamento realizado. Para *C. albicans* as maiores reduções no número de células viáveis ($p < 0,01$) ocorreram com o tratamento de 10 minutos. Já para o biofilme de *S. mutans*, o tempo de tratamento de 10 minutos apresentou-se mais efetivo ($p < 0,05$) somente nos tratamentos com as formulações ETF e TF. Ainda, o tratamento de 1 ou 10 minutos não interferiu no pH dos biofilmes de todos os grupos avaliados. Conclui-se que, embora o pH dos biofilmes tenha se apresentado mais ácido para as formulações testadas comparativamente aos controles, as formulações para enxaguatório bucal testadas apresentaram expressiva atividade antibiofilme contra microrganismos importantes relacionados à cárie dental.

Palavras-chave: *Punica granatum*, Polifosfatos, Fluor, Biofilmes

Curti, W, A. Evaluation of the antibiofilm effect of a mouthwash containing extract of pomegranate peel (*Punica granatum*), sodium trimetaphosphate and fluoride. 2020. Completion of course work (Graduation in Dentistry) - School of Dentistry, Araçatuba, São Paulo State University, Araçatuba 2020.

ABSTRACT

The present study evaluated the action of non-alcoholic mouthwash formulations containing pomegranate peel extract (*Punica granatum*) (E), sodium trimetaphosphate (T) and fluorine (F) against biofilms formed by *Candida albicans* and *Streptococcus mutans*, and their action on the pH of these biofilms. The extract was obtained from the dehydrated pomegranate peel (E) through the filtration and maceration process, being used at a concentration of 3% in the formulations. The concentrations of T and F were 0.3% and 225 ppm in the formulations. The groups of formulations evaluated were: - ETF (containing all assets), TF (containing only T and F) and E (formulation with extract of pomegranate peel only). As controls, Listerine® (C +) was also used, free of alcohol and with a fluoride concentration of 220 ppm, and saline solution (C-). The double biofilms of *Candida albicans* (ATCC 10231) and *Streptococcus mutans* (ATCC 25175) were grown for 24 hours on the surface of hydroxyapatite discs previously treated for 1 minute with each of the formulations. The 24-hour biofilms were treated again for 1 or 10 minutes after their formation, and the viable biofilm cells were quantified. The data were submitted to the normality test (Shapiro-Wilk), followed by one-way ANOVA and the Holm-Sidak multiple comparison test, all with a 1% significance level. All formulations reduced statistically ($p < 0.01$) the biofilm of *C. albicans* and *S. mutans* in relation to the negative control, and the greatest reductions occurred with Listerine, regardless of the treatment time performed. For *C. albicans*, the greatest reductions in the number of viable cells ($p < 0.01$) occurred with the 10-minute treatment. For the *S. mutans* biofilm, the 10-minute treatment time was more effective ($p < 0.05$) only for treatments with ETF and TF formulations. Still, the treatment of 1 or 10 minutes did not affect the pH of the biofilms of all the groups evaluated. It is concluded that, although the pH of biofilms was more acidic for the tested formulations compared to controls, the tested mouthwash formulations showed significant antibiofilm activity against important microorganisms related to dental caries.

Keyword: *Punica granatum*, Polyphosphates, Fluor, Biofilms

LISTA DE TABELAS

TABELA 1 -	Grupos de formulações para enxaguatório bucal e seus constituintes (g)	30
TABELA 2 -	Concentração de compostos fenólicos (mg/g) nas amostras	30
TABELA 3-	Percentual de redução dos biofilmes de <i>C. albicans</i> e <i>S. mutans</i> em relação ao controle negativo quando tratados por 1 e 10 minutos	30
TABELA 4-	pH dos biofilmes de <i>C. albicans</i> e <i>S. mutans</i> em relação ao controle negativo quando tratados por 1 e 10 minutos	31

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 -	Biofilme de <i>C. albicans</i> tratados por 1 e 10 minutos	32
FIGURA 2 -	Biofilme de <i>S. mutans</i> tratados por 1 e 10 minutos	32

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	12
2 OBJETIVO	14
3 MATERIAL E MÉTODOS.....	15
3.1 Obtenção e caracterização do extrato da casca da romã.....	15
3.2 Preparo das formulações para enxaguatório bucal	15
3.3 Quantificação de totais fenólicos.....	15
3.4 Atividade antibiofilme.....	16
3.4.1 Saliva artificial.....	16
3.4.2 Cepas de microorganismos e condições de crescimento	16
3.4.3 Preparação de discos de hidroxiapatita (HA)	17
3.4.4 Formação do biofilme.....	17
3.4.5 Número de células cultiváveis.....	17
3.4.6 Avaliação do pH do biofilme.....	18
3.5 Análise estatística	18
4 RESULTADOS	19
4.1 Totais fenólicos nas formulações para enxaguatório bucal	19
4.2 Ação sobre os biofilmes e seu pH	19
5 DISCUSSÃO	21
6 CONCLUSÃO	24
AGRADECIMENTOS	25
REFERENCIAS	26

1 INTRODUÇÃO

Dentre as principais e mais comuns infecções orais estão a cárie dentária, a gengivite e a periodontite, e uma característica comum nessas patologias é a presença de microrganismos que estão diretamente relacionados com o desenvolvimento ou persistência dessas infecções. O controle ou a remoção desses microrganismos através da escovação dental, utilização de fio dental e enxaguatórios bucais, auxiliam no controle e prevenção dessas doenças (Batista, Lins et al. 2014).

Muitas revisões têm abordado a utilização de enxaguatórios bucais como uma alternativa benéfica para o controle de biofilmes microbianos relacionados à carie (Bhadbhade, Acharya et al. 2011) devido a facilidade de utilização, acesso a microrganismos não alcançadas por processos mecânicos e baixo custo. Além disso, os enxaguatórios bucais podem ser uma medida tópica para aplicação de flúor devido ao contato com os dentes, realizando um efeito protetor (Favretto, Danelon et al. 2013).

Dentre os agentes químicos utilizados está a clorexidina que é considerada como padrão ouro. Contudo, sua prescrição deve ser limitada a curtos períodos de tempo por poderem provocar pigmentação dos dentes e língua, alterações no paladar, descamação epitelial, sensações de queimação e sabor amargo (Bhadbhade, Acharya et al. 2011); (Dabholkar, Shah et al. 2016). Além da clorexidina, os óleos essenciais são muito utilizados, porém o alto teor alcoólico e o sabor desagradável muitas vezes não são bem tolerados pelos pacientes (Bhadbhade, Acharya et al. 2011); (Dabholkar, Shah et al. 2016).

O aumento na resistência dos microrganismos aos tratamentos convencionais e efeitos colaterais causados por esses produtos associados a uma maior abertura da medicina tradicional a novas alternativas de tratamento, vem fazendo com que a pesquisa e o desenvolvimento de produtos utilizando compostos naturais cresçam consideravelmente (Bhadbhade, Acharya et al. 2011); (Akca, Akca et al. 2016).

A romã tem sido utilizada no Brasil no tratamento de infecções de garganta, roquidão, febre, anti-séptico e antiviral em processos inflamatórios da mucosa oral (Matos, Garland et al. 2002). A sua casca contém aproximadamente 20% de taninos ativos, incluindo punicalagina, punicalina e corilagina (Menezes, Cordeiro et al. 2006). Além disso, seu efeito benéfico em processos inflamatórios como a gengivite pode estar relacionado com a presença de flavonoides que possuem uma alta atividade antioxidante e estimulam enzimas endógenas com essa mesma função (Bhadbhade, Acharya et al. 2011). Estudos mostram que a romã apresenta atividade antimicrobiana contra uma variedade de microrganismos presentes no biofilme dental,

incluindo o *Streptococcus mutans* (Bhadbhade, Acharya et al. 2011). Acredita-se que a ação da romã relaciona-se com a redução da capacidade de adesão desses microrganismos na superfície do dente, e da produção de enzimas responsáveis pelo metabolismo da sacarose, dificultando assim o desenvolvimento da cárie (Bhadbhade, Acharya et al. 2011). Além disso, bochechos com extrato da romã reduziriam os níveis salivares de outras enzimas como, por exemplo, a aspartato-aminotransferase, que está relacionada com lesões celulares e é encontrada em altos níveis em pacientes com doença periodontal (Bhadbhade, Acharya et al. 2011)

Devido a sua facilidade de uso, a literatura sugere que além de agentes antimicrobianos, os enxaguatórios bucais contenham outros componentes para auxiliar no controle do desenvolvimento de patologias bucais. Nesse contexto a associação de flúor e fosfatos inorgânicos como o trimetafosfato de sódio (TMP) atuaria na redução do processo de desmineralização presente na cárie dentária. Já é demonstrado que a adição de TMP a uma solução fluoretada otimiza a capacidade do flúor na redução da desmineralização do esmalte (Takeshita, Castro et al. 2009); (Moretto, Magalhaes et al. 2010); (Manarelli, Vieira et al. 2011); (Takeshita, Exterkate et al. 2011); (Favretto, Danelon et al. 2013), e isso ocorreria provavelmente devido a capacidade de se ligarem e permanecerem ligados à superfície do esmalte modificando a permeabilidade da mesma aos íons cálcio, flúor e aos ácidos presentes nos desafios cariogênicos (McGaughey and Stowell 1977) (van Dijk, Borggreven et al. 1980); (Takeshita, Exterkate et al. 2011). Sendo assim, pensando-se nas propriedades da romã e desse fosfato juntamente com o fluoreto de sódio, o desenvolvimento de um enxaguatório bucal contendo esses compostos poderia contribuir consideravelmente na prevenção e controle da doença cárie.

2 OBJETIVO

O objetivo do presente estudo foi avaliar a ação de formulações não alcoólicas para enxaguatório bucal contendo extrato da casca da romã (*Punica granatum*) (E), trimetafosfato de sódio (T) e flúor (F) contra biofilmes formados por *Candida albicans* e *Streptococcus mutans*, e sua ação sobre o pH destes biofilmes.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Obtenção e caracterização do extrato da casca da romã

A casca da romã (*Punica granatum*), já desidratada, triturada e esterilizada, foi obtida em lote único da Companhia Santos Flora (Santos Flora Com. De Ervas, Mairiporã, SP - Brasil). O produto possui certificados das agências reguladoras ANVISA, CETESB, IBAMA e FDA, além de análises farmacopéicas e microbiológicas. De acordo com as características da casca da romã, foi utilizada a técnica da maceração para o processo de extração. Etanol 70% GL (70° GL) foi utilizado na proporção de 1:3 por 24 horas. Esta mistura foi filtrada a vácuo, separando o extrato bruto e a borra. Nessa borra, o etanol 70° GL foi adicionado novamente e realizada a maceração. Esse processo foi repetido cinco vezes até que não houvesse mais sólidos solúveis presentes no extrato, indicando possível exaustão pelo processo extrator. Essas 5 frações foram misturadas e concentradas em um roto-evaporador a vácuo até o extrato mole ser obtido. Posteriormente, o extrato mole foi diluído em propilenoglicol e caracterizado com teor de sólidos (secagem em estufa), onde foi padronizado em % de sólidos (30,1%).

3.2 Preparo das formulações para enxaguatório bucal

As formulações foram preparadas de acordo com seu princípio ativo em: 3% de extrato da casca de romã (E), 0,3% de trimetafosfato de sódio (TMP) e 225 ppm de flúor (F) (Favretto, Danelon et al., 2013). Para todos os grupos de formulações foram utilizados agentes estabilizantes, conservantes microbiológicos, quelantes, adoçantes, umectantes e água e todos tiveram seu pH ajustado para 7,0 (Tabela 1). Como controles positivo e negativo utilizou-se Listerine® (C⁺) livre de álcool e com concentração de flúor de 220 ppm e solução salina (C⁻).

3.3 Quantificação de totais fenólicos

Para estabelecer os totais fenólicos presentes nas formulações contendo extrato da casca de *Punica granatum* (E), foi realizada uma curva analítica de ácido gálico (Fernandes et al., 2018; Waterman; Mole 1994). Todas as formulações e a solução padrão de ácido gálico foram preparadas em um balão volumétrico de 50 mL usando água como solvente. As formulações permaneceram em um banho ultrassônico por 30 minutos. Uma alíquota de 0,5 mL foi transferida para outro balão de 50 mL, onde 2,5 mL de reagente Folin-Denis (Qhemis-High Purity, Hexis, São Paulo, Brasil) e 5,0 mL de 29% de carbonato de sódio (Cinética, São Paulo,

Brazil) foram adicionados. As soluções foram protegidas da luz e as leituras foram realizadas após 30 min em um espectrofotômetro UV-Vis a 760 nm (Oliveira et al., 2013).

3.4 Atividade antibiofilme

3.4.1 Saliva artificial

A saliva artificial usada nesse experimento foi baseada no protocolo de Lamfon et al, (2013), com a seguinte composição para 1L de água deionizada: 2g de extrato de levedura (Sigma-Aldrich, San Luis, Missouri, EUA), 5g de peptona bacteriológica (Sigma-Aldrich), 2g de glicose (SigmaAldrich), 1g de mucina de estômago de porco (Sigma-Aldrich), 0,35g de NaCl (Sigma-Aldrich), 0,2g de CaCl₂ (Sigma-Aldrich) e 0,2 g de KCl (Sigma-Aldrich). O pH final foi ajustado a 6,8 usando NaOH (Sigma-Aldrich) (Lamfon, Porter et al. 2003)

3.4.2 Cepas de microrganismos e condições de crescimento

Duas cepas de referência da American Type Culture Collection (ATCC) foram usadas neste estudo: *Candida albicans* ATCC 10231 e *Streptococcus mutans* ATCC 25175. As cepas foram cultivadas conforme descrito por Arias et al. (2016). O número de células de *Candida albicans* foi ajustado usando uma câmara de Neubauer para uma concentração de 1×10^7 células/mL em saliva artificial e *Streptococcus mutans* foi ajustado por espectroscopia (densidade óptica 640 nm = 1,6). em 1×10^8 células (Arias, Delbem et al. 2016).

3.4.3 Preparação de discos de hidroxiapatita (HA)

Os discos HA foram feitos e caracterizados de acordo com Arias et al, (2016). 0,650 g de pó HA (Sigma-Aldrich) foi adicionado a uma matriz de aço inoxidável (SKAY, São José do Rio Preto, Brasil) e levado a uma prensa hidráulica onde foi submetido a uma carga de 25 t. Após o seu preparo, os discos obtidos apresentaram 13 mm de diâmetro e 3 mm de espessura, e para sua esterilização utilizou-se óxido etileno (Oximed - Tecnologia em Esterilização, São José do Rio Preto, SP, Brasil).

3.4.4 Formação de biofilme

Baseado no protocolo de Pandit et al. (2018), com algumas modificações, os discos foram posicionados verticalmente em suportes confeccionados com fios ortodônticos no interior de poços de placas de microtitulação de 24 poços. Previamente ao crescimento dos

biofilmes mistos de *Candida albicans* e *Streptococcus mutans*, os discos foram condicionados em 2 mL de saliva artificial por 1 hora a 37 °C a 5% CO₂. Em seguida, foi retirada a saliva e 2 ml das formulações ETF, TF e E e Listerine® (controle positivo) foram adicionados e mantidos em contato com os discos por 1 minuto. Os discos foram lavados em solução salina e, posteriormente, 2 ml do inóculo duplo (*C. albicans* e *S. mutans*) foi adicionado aos discos de HA que eram anteriormente tratados com cada formulação para enxaguatório bucal. Em seguida, as placas de 24 poços foram incubadas (37° C; 5% CO₂) por 24 horas e os discos tratados por 1 minuto ou 10 minutos com cada formulação.

3.4.5 Número de Unidades Formadoras de Colônias (UFC)

O número de células cultiváveis presentes no biofilme misto formado nos discos de HA foi quantificado pelo número de unidades formadoras de colônia (UFC). Os discos de HA foram adicionados em tubos falcon contendo 3 mL de solução salina, então, os tubos foram levados a um banho ultrassônico (Elmasonic p30H; Elma Schmidbauer, Baden-Württemberg, Alemanha) por 10 minutos e em seguida, agitado em vórtex (Tecnal Equipamentos Científicos, Puracicaba, SP, Brasil) por 30 segundos e diluições decimais em série (solução salina) foram semeadas em CHROMagar Candida (Difco, Le Pont de Claix, France) e BHI Agar (BHI; Difco) suplementado com anfotericina B a 7 µg ml⁻¹, respectivamente, para a contagem de colônias de *Candida albicans* e *Streptococcus mutans*. Após 24 e 48 horas de incubação, o número de colônias viáveis foi quantificado *C. albicans* e *S. mutans* e expresso em log₁₀ e padronizado por unidade de área (Log₁₀ CFU cm⁻²) de discos HA.

3.4.6 Avaliação de pH do biofilme

Os biofilmes tratados com ETF, TF, E e Listerine®, foram transferidos para novos tubos estéreis Falcon e centrifugados por 5 minutos a 8.000 rpm (Combi – 514; Hanil Scientific Inc., Aayukro, Rep. da Coreia). O sobrenadante foi, então, filtrado com filtro de membrana de 0,22 µm (Corning Inc., Corning, NY, EUA) e subsequentemente o pH foi medido (Eletrodo de pH - 2A09E, Analyzer, São Paulo, SP, Brasil).

3.5 Análise estatística

Todos os ensaios foram realizados em triplicata. O programa SigmaPlot 12.0 (Systat Software Inc., San Jose, EUA) foi empregado para a análise estatística com um nível de confiança de 95%. Os testes foram submetidos ao teste de normalidade (Shapiro-Wilk) e a

análise de variância (ANOVA-um fator) foi aplicada, seguida pelo teste de Holm-Sidak ($\alpha=0,001$).

4 RESULTADOS

4.1 Totais Fenólicos nas formulações para enxaguatório bucal

A Tabela 2 ilustra a média dos totais fenólicos expressos em ácido gálico (mg/mg), encontrados em cada formulação contendo 3% de E (formulações de ETF e E) usando o teste colorimétrico de Folin-Denis (Fernandes et al., 2018; Waterman; Mole 1994). Seu conteúdo correspondeu a 10% do extrato glicólico de romã com uma média de 11,54 mg/g.

4.2 Ação antibiome e avaliação do pH

Ensaio de biofilme *in vitro* foram conduzidos usando cepas de referência de importantes patógenos envolvidos com cárie dentária para verificar se as formulações para enxaguatório bucal produzidas contendo extrato da casca de romã (E), TMP e F reduziram a quantidade de células viáveis de *C. albicans* e *S. mutans* cultivadas em biofilmes de 24 horas sobre a superfície de discos de HA. Para determinar se o aumento do tempo de exposição do biofilme a essas formulações melhora sua eficácia, tratamos esse biofilme duplo por 1 ou 10 minutos. Também, a fim de elucidar o efeito dos enxaguatórios bucais no ambiente do biofilme, o pH dos biofilmes de 24 horas tratados por 1 e 10 minutos foram mensurados.

Conforme apresentado nas Figuras 1 e 2, todos os enxaguatórios bucais reduziram significativamente as células do biofilme para *C. albicans* e *S. mutans*. Da mesma forma que o positivo controle (Listerine®), as formulações ETF, TF e E produziram uma significativa redução de células de *C. albicans* em comparação com o controle negativo ($p < 0,001$). Embora não tenha havido diferença significativa entre os tempos de 1 e 10 minutos de tratamento com as formulações ETF, TF e E, os percentuais de redução do biofilme de *C. albicans* aumentaram consideravelmente com a exposição de 10 minutos (Tabela 3).

Os resultados também demonstraram que as células do biofilme de *S. mutans* expostas por 10 minutos com as formulações ETF e TF foram significativamente mais suscetíveis do que à exposição de 1 minuto ($p < 0,001$), enquanto para a formulação E e Listerine®, o tempo de exposição não teve influência significativa na redução de células de *S. mutans* ($p > 0,05$).

Entre as formulações ETF, TF e E, as maiores taxas de redução de células viáveis foram exibidas para ETF com 10 minutos de tratamento, independentemente do microrganismo testado (Tabela 3).

Conforme mostrado na Tabela 4, o pH mais alto foi encontrado em biofilmes que não receberam tratamento (controle negativo) e aqueles tratados com Listerine® (controle positivo), seguidos por biofilmes tratados com E, ETF e TF.

5 DISCUSSÃO

O efeito antimicrobiano das formulações em biofilme misto de *C. albicans* e *S. mutans* formados por 24 horas e tratados por 1 ou 10 minutos mostraram que, embora não tenha havido diferença estatística entre as formulações ETF, TF e E, todas reduziram significativamente o número de células viáveis no biofilme.

O mecanismo de ação dos compostos presentes nas formulações e as características específicas dos microrganismos testados (bactérias e fungos), podem ter influenciado diretamente esses resultados. *S. mutans* é uma bactéria anaeróbia gram-positiva facultativa presente no biofilme dental e está relacionado a um dos inúmeros fatores etiológicos da cárie dentária (Farkash, Feldman et al. 2019). Os fatores de virulência dessa bactéria estão relacionados à acidogenia (produção de ácido láctico principalmente), propriedades acidúricas, além dessa bactéria utilizar a sacarose da dieta para sintetizar grandes quantidades de polissacarídeos extracelulares (EPS) principalmente glucanos sintetizados por glucosiltransferases (Brighenti, Luppens et al. 2008, Gulube e Patel 2016, Cavazana, Hosida et al. 2019, Farkash, Feldman et al. 2019, Philip, Leishman et al. 2019). A *C. albicans*, por outro lado, é um fungo patogênico oportunista (Kim e Sudbery 2011, Farkash, Feldman et al. 2019) e sua virulência está relacionada à transição de sua forma de levedura para hifas (Finkel e Mitchell 2011). Este fungo é conhecido por ser um colonizador de lesões de cárie (Philip, Leishman et al. 2019) e também por ter a capacidade de produzir ácidos e EPS (Farkash, Feldman et al. 2019). Além disso, a relação simbiótica entre *S. mutans* e *C. albicans* permite a formação de um biofilme mais robusto tanto *in vitro* como *in vivo*. (Farkash, Feldman et al. 2019, Philip, Leishman et al. 2019).

Acredita-se que compostos fenólicos presentes nos extratos naturais sejam responsáveis por sua atividade antimicrobiana (Brighenti, Luppens et al. 2008). Em geral, a atividade antimicrobiana do extrato de casca de *Punica granatum* pode ser devido à presença substancial de quantidades de fitocompostos como flavonóides (como quercetina, rutina, naringenina, luteolina, pelargonidina, prodelfinidina, kaempferol e flavan) (Shafiqhi, Amjad et al. 2012), e taninos hidrolisáveis (incluindo galato de metila, pedunalagina, punicalina, punicalagina, ácido gálico e elágico). Esses fitocompostos podem atuar na parede celular e na membrana celular de microrganismos, uma vez que podem precipitar proteínas, além de inibir enzimas como a glucosiltransferase, dificultando a adesão de microrganismos (Ismail, Sestili et al. 2012, Aravindraj, M. Preethi et al. 2017).

Scalbert em 1991 mostrou que os taninos têm atividade antimicrobiana contra fungos e bactérias (Scalbert 1991). Koo et al. (2006) observaram que o suco de *cranberry* inibiu a atividade da enzima glicosiltransferase em biofilmes de *S. mutans* (Koo, Nino de Guzman et al. 2006). Brighenti et al. (2008) observaram através de estudos proteômicos que o extrato de *P. cattleianum* inibiu proteínas responsáveis pela síntese de RNA, e em *S. mutans* foi observada a redução de sete proteínas importantes no metabolismo de carboidratos e produção de ácido láctico, sendo este mecanismo diretamente ligado ao desenvolvimento da cárie dentária (Brighenti, Luppens et al. 2008). Farkash et al. (2019) observaram que a combinação de polifenóis da medicina tibetana e chá verde possuem a capacidade de inibir o crescimento de *S. mutans* e *C. albicans*, reduzindo o número de células e a produção de EPS (Farkash, Feldman et al. 2019).

Vasconcelos et al. (2006) testaram um gel formulado com *Punica granatum* em *C. albicans* e *S. mutans* (isolados e combinados) e observaram a ação significativa contra *C. albicans*, mas não superior ao antifúngico comercial Miconazol (Vasconcelos, Sampaio et al. 2006). Endo et al. (2010) também demonstraram uma forte atividade do extrato bruto de *Punica granatum* contra *C. albicans*, mostrando através de microscopia eletrônica de transmissão mudanças morfológicas nas células como padrões de brotamento irregulares e pseudo-hifas, espessamento da parede celular, mudanças no espaço entre a parede celular e a membrana plasmática, bem como redução do conteúdo citoplasmático (Endo, Cortez et al. 2010). Gulube e Patel (2016) mostraram que o extrato de *P. granatum* pode afetar a produção de ácido e EPS em um biofilme de *S. mutans* e esses resultados não prejudicaram o equilíbrio da microbiota oral (Gulube e Patel 2016).

Além disso, a associação de TMP e F com o extrato pode ter contribuído na ação antimicrobiana. Cavazzana et al. (2019) mostraram que o TMP e o F reduziram o número de células viáveis de *S. mutans*, e o TMP à 0,25% diminuiu a biomassa total e componentes da matriz extracelular de um biofilme de *C. albicans* e *S. mutans* (Cavazana, Hosida et al. 2019).

Outro dado interessante encontrado em nosso estudo é que o pH dos biofilmes após tratamento por 1 e 10 minutos com as formulações produzidas mantiveram-se ácidos (entre 5,09 a 5,28), principalmente para biofilmes tratados com formulações ETF e TF. Contudo, mesmo com esses valores baixos houve reduções entre 1 e 2 logs para os biofilmes de *C. albicans* e *S. mutans* quando tratados com essas formulações. Esses valores de pH também foram encontrados por outros autores quando os biofilmes foram tratados com extratos naturais e flúor. Da mesma forma, Pandit et al. (2018), em biofilmes de *S. mutans* formados por 22 horas

e tratados por um minuto com 100 e 300 ppm de flúor encontraram valores de pH baixos, fato este também constatado por Brighenti et al. (2008).

Em relação a maior eficácia do Listerine® em relação a todas as formulações desenvolvidas, é importante que, ao se buscar um novo produto, que outras propriedades sejam investigadas. Entre elas a sua toxicidade celular e ação pró-inflamatória. Guandalini et al. (2020) mostraram que o Listerine® sem álcool precisou ser diluído quatro vezes para evitar ser considerado tóxico em células epiteliais HaCaT (Guandalini Cunha, Duque et al. 2020). Park et al. (2014) também evidenciaram que esse mesmo produto reduziu a viabilidade celular de células-tronco do tecido adiposo bucal. Ao contrário do Listerine® (Park, Lee et al. 2014), o extrato de *P. granatum* não mostraram um efeito citotóxico nas células de fibroblastos L929 (Fernandes, Berretta et al. 2018), assim como as mesmas formulações estudadas no presente trabalho não reduziram a viabilidade celular de macrófagos extraídos de células tronco da medula óssea de camundongos (manteve-se em praticamente 100%), enquanto que o Listerine® promoveu uma redução de 30 dessa viabilidade além de produzir maiores concentrações citoninas pró-inflamatórias (IL-6 e TNF- α) quando comparado às formulações contendo extrato da casca de romã (dados ainda não publicados).

6 CONCLUSÃO

Conclui-se que, embora o pH dos biofilmes tenha se apresentado mais ácido para as formulações testadas comparativamente aos controles, as formulações para enxaguatório bucal testadas apresentaram expressiva atividade antibiofilme contra microrganismos importantes relacionados à cárie dental. Assim, cria-se uma perspectiva promissora para o desenvolvimento de um produto odontológico comercial sem álcool com os benefícios à saúde milenarmente reconhecidos da *Punica granatum*.

AGRADECIMENTOS

Agradecemos à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001. Agradecemos o desenvolvimento e a análise das formulações de enxaguatório bucal pela Apis Flora Indl. Coml. Ltda. e pelo uso de suas instalações.

REFERÊNCIAS

Akca, A. E., G. Akca, F. T. Topcu, E. Macit, L. Pikdoken and I. S. Ozgen (2016). "The Comparative Evaluation of the Antimicrobial Effect of Propolis with Chlorhexidine against Oral Pathogens: An In Vitro Study." *Biomed Res Int* **2016**: 3627463.

Aravindraj, S., M. M. Preethi and B. Sivapathasundharam (2017). "Antimicrobial Effects of *Punica granatum* Extracts on *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus mutans*, *Lactobacillus acidophilus*, *Enterococcus faecalis* and *Candida albicans*." *International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences* **6(9)**: 2762-2774

Arias, L. S., A. C. Delbem, R. A. Fernandes, D. B. Barbosa and D. R. Monteiro (2016). "Activity of tyrosol against single and mixed-species oral biofilms." *J Appl Microbiol* **120(5)**: 1240-1249

Batista, A. L., R. D. Lins, R. de Souza Coelho, D. do Nascimento Barbosa, N. Moura Belem and F. J. Alves Celestino (2014). "Clinical efficacy analysis of the mouth rinsing with pomegranate and chamomile plant extracts in the gingival bleeding reduction." *Complement Ther Clin Pract* **20(1)**: 93-98

Bhadbhade, S. J., A. B. Acharya, S. V. Rodrigues and S. L. Thakur (2011). "The antiplaque efficacy of pomegranate mouthrinse." *Quintessence Int* **42(1)**: 29-36.

Brighenti, F. L., S. B. Luppens, A. C. Delbem, D. M. Deng, M. A. Hoogenkamp, E. Gaetti-Jardim, Jr., H. L. Dekker, W. Crielaard and J. M. ten Cate (2008). "Effect of *Psidium cattleianum* leaf extract on *Streptococcus mutans* viability, protein expression and acid production." *Caries Res* **42(2)**: 148-154

Cavazana, T. P., T. Y. Hosida, J. P. Pessan, C. Sampaio, D. R. Monteiro and A. C. B. Delbem (2019). "Activity of sodium trimetaphosphate, associated or not with fluoride, on dual-species biofilms." *Biofouling*: 1-9.

Dabholkar, C. S., M. Shah, R. Kathariya, M. Bajaj and Y. Doshi (2016). "Comparative Evaluation of Antimicrobial Activity of Pomegranate-Containing Mouthwash Against Oral-Biofilm Forming Organisms: An Invitro Microbial Study." *J Clin Diagn Res* **10**(3): ZC65-69.

de Oliveira, J. R., V. C. de Castro, P. das Gracas Figueiredo Vilela, S. E. Camargo, C. A. Carvalho, A. O. Jorge and L. D. de Oliveira (2013). "Cytotoxicity of Brazilian plant extracts against oral microorganisms of interest to dentistry." *BMC Complement Altern Med* **13**: 208.

Endo, E. H., D. A. Cortez, T. Ueda-Nakamura, C. V. Nakamura and B. P. Dias Filho (2010). "Potent antifungal activity of extracts and pure compound isolated from pomegranate peels and synergism with fluconazole against *Candida albicans*." *Res Microbiol* **161**(7): 534-540.

Favretto, C. O., M. Danelon, F. C. Castilho, A. E. Vieira and A. C. Delbem (2013). "In vitro evaluation of the effect of mouth rinse with trimetaphosphate on enamel demineralization." *Caries Res* **47**(5): 532-538.

Fernandes, R. A., A. A. Berretta, E. C. Torres, A. F. M. Buszinski, G. L. Fernandes, C. C. MendesGouvea, F. N. de Souza-Neto, L. F. Gorup, E. R. de Camargo and D. B. Barbosa (2018). "Antimicrobial Potential and Cytotoxicity of Silver Nanoparticles Phytosynthesized by Pomegranate Peel Extract." *Antibiotics (Basel)* **7**(3): 51

Guandalini Cunha, B., C. Duque, K. Sampaio Caiaffa, L. Massunari, I. Arague Catanoze, D. M. Dos Santos, S. H. P. de Oliveira and A. M. Guiotti (2020). "Cytotoxicity and antimicrobial effects of citronella oil (*Cymbopogon nardus*) and commercial mouthwashes on *S. aureus* and *C. albicans* biofilms in prosthetic materials." *Arch Oral Biol* **109**: 104577.

Gulube, Z. and M. Patel (2016). "Effect of *Punica granatum* on the virulence factors of cariogenic bacteria *Streptococcus mutans*." *Microb Pathog* **98**: 45-49.

Ismail, T., P. Sestili and S. Akhtar (2012). "Pomegranate peel and fruit extracts: a review of potential anti-inflammatory and anti-infective effects." *J Ethnopharmacol* **143**(2): 397-405

Koo, H., P. Nino de Guzman, B. D. Schobel, A. V. Vacca Smith and W. H. Bowen (2006). "Influence of cranberry juice on glucan-mediated processes involved in *Streptococcus mutans* biofilm development." *Caries Res* **40**(1): 20-27.

Lamfon, H., S. R. Porter, M. McCullough and J. Pratten (2003). "Formation of *Candida albicans* biofilms on non-shedding oral surfaces." *Eur J Oral Sci* **111**(6): 465-471.

Manarelli, M. M., A. E. Vieira, A. A. Matheus, K. T. Sasaki and A. C. Delbem (2011). "Effect of mouth rinses with fluoride and trimetaphosphate on enamel erosion: an in vitro study." *Caries Res* **45**(6): 506-509.

Matos, A., J. L. Garland and W. F. Fett (2002). "Composition and physiological profiling of sprout-associated microbial communities." *J Food Prot* **65**(12): 1903-1908

McGaughey, C. and E. C. Stowell (1977). "Effects of polyphosphates on the solubility and mineralization of HA: relevance to a rationale for anticaries activity." *J Dent Res* **56**(6): 579-587

Menezes, S. M., L. N. Cordeiro and G. S. Viana (2006). "*Punica granatum* (pomegranate) extract is active against dental plaque." *J Herb Pharmacother* **6**(2): 79-92

Moretto, M. J., A. C. Magalhaes, K. T. Sasaki, A. C. Delbem and C. C. Martinhon (2010). "Effect of different fluoride concentrations of experimental dentifrices on enamel erosion and abrasion." *Caries Res* **44**(2): 135-140

Pandit, S., J. E. Jung, H. M. Choi and J. G. Jeon (2018). "Effect of brief periodic fluoride treatments on the virulence and composition of a cariogenic biofilm." *Biofouling* **34**(1): 53-61

Park, J. B., G. Lee, B. G. Yun, C. H. Kim and Y. Ko (2014). "Comparative effects of chlorhexidine and essential oils containing mouth rinse on stem cells cultured on a titanium surface." *Mol Med Rep* **9**(4): 1249-1253.

Scalbert, A. (1991). "Antimicrobial properties of tannins." *Phytochemistry* **30**(12): 3875-3883

Takeshita, E. M., L. P. Castro, K. T. Sasaki and A. C. Delbem (2009). "In vitro evaluation of dentifrice with low fluoride content supplemented with trimetaphosphate." *Caries Res* **43**(1): 50-56.

Takeshita, E. M., M. Danelon, L. P. Castro, K. T. Sasaki and A. C. Delbem (2015). "Effectiveness of a Toothpaste with Low Fluoride Content Combined with Trimetaphosphate on Dental Biofilm and Enamel Demineralization in situ." *Caries Res* **49**(4): 394-400.

Takeshita, E. M., R. A. Exterkate, A. C. Delbem and J. M. ten Cate (2011). "Evaluation of different fluoride concentrations supplemented with trimetaphosphate on enamel de- and remineralization in vitro." *Caries Res* **45**(5): 494-497.

Vasconcelos, L. C., F. C. Sampaio, M. C. Sampaio, S. Pereira Mdo, J. S. Higino and M. H. Peixoto (2006). "Minimum inhibitory concentration of adherence of *Punica granatum* Linn (pomegranate) gel against *S. mutans*, *S. mitis* and *C. albicans*." *Braz Dent J* **17**(3): 223-227

van Dijk, J. W., J. M. Borggreven and F. C. Driessens (1980). "The effect of some phosphates and a phosphonate on the electrochemical properties of bovine enamel." *Arch Oral Biol* **25**(8-9): 591-595.

Waterman, P. G. and S. Mole (1994). " Analysis of Phenolic Plant Metabolites." Blackwell Scientific: Oxford, UK; Boston, MA, USA,.

TABELAS E FIGURAS

TABELA 1 - Grupos de formulações para enxaguatório bucal e seus constituintes (g).

Matéria-prima/função	ETF	TF	E
Extrato glicólico da casca de romã	10,40	-	10,40
Estabilizante	0,50	0,50	0,50
Conservante microbiológico	0,10	0,10	0,10
Quelante	0,01	0,01	0,01
Fluoreto de sódio	0,02	0,02	-
TMP	0,20	0,20	-
Edulcorante I	7,50	7,50	7,50
Edulcorante II	10,00	10,00	10,00
Água purificada q.s.p	100	100	100

TABELA 2 – Média e desvio padrão da concentração de compostos fenólicos (mg/g) expressos em ácido gálico nas amostras

Amostras Avaliadas	Fenóis Totais expressos em Ácido Gálico (mg/mg) (média±SD)
Extrato Glicólico de Romã	114,98 ± 3,55
Formulação ETF	11,59 ± 0,55
Formulação TF	0,53 ± 0,07
Formulação E	11,56 ± 0,01

TABELA 3 - Percentual de redução dos biofilmes de *C. albicans* e *S. mutans* em relação ao controle negativo quando tratados por 1 ou 10 minutos.

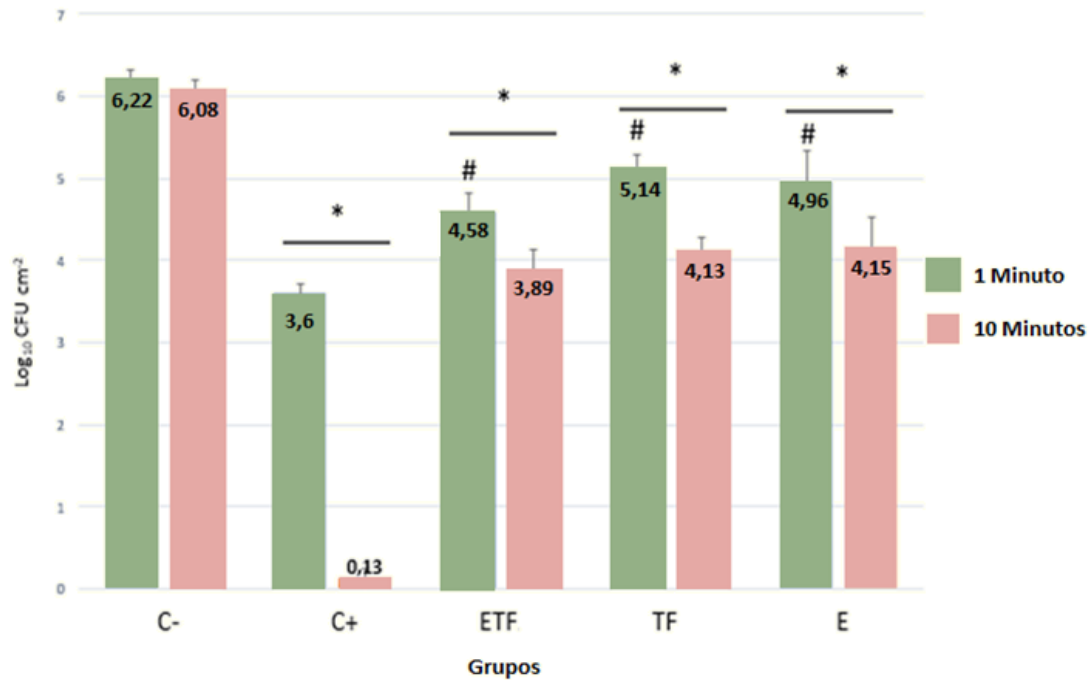
Biofilme-24h	% Redução do Biofilme			
	<i>Candida albicans</i>		<i>Streptococcus mutans</i>	
Grupos/Tratamentos (min)	1	10	1	10
ETF	26	36	12	36
TF	17	32	11	28
E	20	32	25	28

Controle positivo (Listerine®)	42	-	53	56
Controle negativo (Solução salina)	-	-	-	-

TABELA 4 - pH dos biofilmes de *C. albicans* e *S. mutans* quando tratados por 1 ou 10 minutos

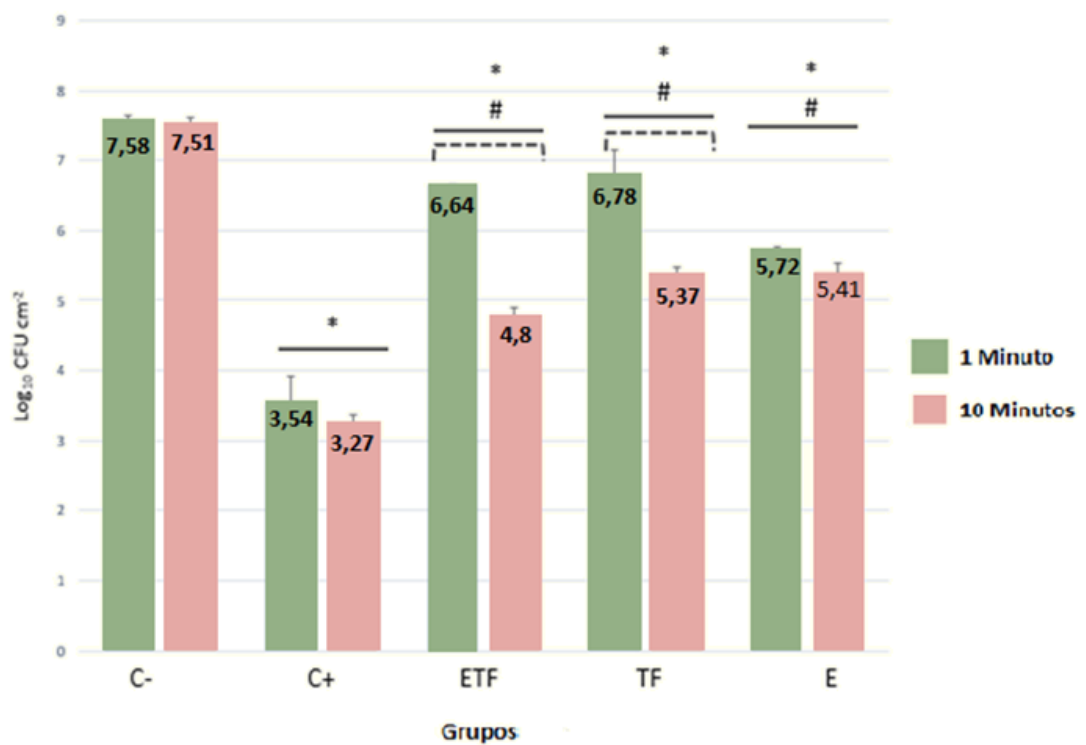
Biofilme-24h	pH	
	<i>Candida albicans</i> e <i>Streptococcus mutans</i>	
	1	10
Grupos/Tratamento (min)		
ETF	5.15	5.20
TF	5.10	5.09
E	5.28	5.28
Controle positivo (Listerine®)	5.67	5.51
Controle negativo (Solução salina)	5.45	5.51

Figura 1 - Biofilme de *C. albicans* tratados por 1 e 10 minutos



Efeito do tratamento com as formulações por 1 ou 10 minutos em células de biofilme de *C. albicans*. As barras representam a média \pm DP de cinco grupos. * $p < 0,05$ versus controle negativo; # ETF2 (1 min), TF2 (1 min) e E (1 min) versus C + (1 min)

Figura 2 - Biofilme de *S. mutans* tratados por 1 e 10 minutos



Efeito do tratamento com soluções por um e 10 minutos em células de biofilme de *S. mutans*. Os dados representaram a média \pm DP de cinco grupos. * $p < 0,05$ versus controle negativo; # ETF, TF e E versus controle positivo; --- ETF (1 min) versus ETF (10 min) e TF (1 min) versus TF2 (10 min).

