

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
CÂMPUS DE ARARAQUARA

**ATIVIDADE BIOLÓGICA DE GEL DENTIFRÍCIO E
ENXAGÜATÓRIO BUCAL CONTENDO EXTRATOS VEGETAIS**

CYNTHIA HELENA GONTIJO CORDEIRO
FARMACÊUTICA BIOQUÍMICA INDUSTRIAL

ARARAQUARA - SP
2005

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
CÂMPUS DE ARARAQUARA

**ATIVIDADE BIOLÓGICA DE GEL DENTIFRÍCIO E
ENXAGÜATÓRIO BUCAL CONTENDO EXTRATOS VEGETAIS**

CYNTHIA HELENA GONTIJO CORDEIRO
FARMACÊUTICA BIOQUÍMICA INDUSTRIAL

ORIENTADOR: Prof. Dr. Luis Vitor Silva do Sacramento

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas, Área de Pesquisa e Desenvolvimento de Fármacos e Medicamentos, da Faculdade de Ciências Farmacêuticas, UNESP, como parte dos requisitos necessários para a obtenção do título de Mestre em Ciências Farmacêuticas.

ARARAQUARA - SP
2005

*“Leave it behind
You’ve got to leave it behind
All that you fashion
All that you make
All that you build
All that you break
All that you measure
All that you steal
All that you can leave behind
All that you reason
All that you sense
All that you speake
All that you dress up
All that you scheme...
And love is not the easy thing
The only baggage you can bring...
Is all that you can’t leave behind...”*

(U2 - Walk on)

*Aos meus pais, Cícero e Maria de Lourdes,
pelo incentivo e pelo amor incondicional.
Aos meus irmãos, Fá, Lê e Jê,
pelo carinho.*

*Ao Igor,
pelo amor e companheirismo.*

*Ao Flávio e Maria Tereza,
pelo carinho e pela acolhida.*

*À Deus,
pela benção do Seu amor e da Sua presença.*

*“E aqui de joelhos eu estou
contemplando a última estrela
cantando a canção da alvorada...
prá te louvar,
prá te reconhecer,
prá te adorar,
prá ver no sol que nada sou sem tua luz,
só pra saber que nada sou sem Ti, Jesus.”
(João Alexandre)*

AGRADECIMENTOS

À todos vocês que contribuíram para a realização deste trabalho, pela amizade, incentivo e apoio, fundamentais para meu crescimento profissional, meu sincero agradecimento.

Ao Prof. Dr. Luis Vitor Silva do Sacramento, pela orientação, incentivo, compreensão e paciência, pela amizade e seu bom humor durante os tempos de convivência.

Ao Prof. Dr. Marcos Antônio Corrêa, pelas contribuições relativas ao desenvolvimento das formulações, pelos conhecimentos transmitidos e pelo apoio.

À Profa. Dra. Elza Helena Guimarães Lara, por ceder seu laboratório para a produção do gel dentifrício em condições adequadas e pela experiência transmitida.

Ao Prof. Dr. Antônio Carlos Pizzolitto, pelo acompanhamento da realização dos estudos microbiológicos, pela disposição e paciência.

À Profa. Dra. Iracilda Zeppone Carlos, pelo acompanhamento dos estudos imunológicos e pelo apoio.

À Profa. Dra. Maria do Carmo Longo, pelo acompanhamento dos estudos de atividade antiinflamatória, pelo carinho e pelo apoio.

À Profa. Dra. Rosemary Adriana Chiérici Marcantonio, pelo acompanhamento da realização dos estudos clínicos.

À Profa. Dra. Taís Maria Bauab, pelas contribuições e pelo apoio.

À amiga Angélica, pela força, pelo carinho e amizade.

Aos amigos do Laboratório de Botânica, Allynsson, André, Douglas e Helen, pela força e amizade.

As amigas do Laboratório de Imunologia Clínica, Marisa, Fernanda (Ber), Flávia, Márcia, Danielle, Cleni, Michele, Nayara, Camila, Amanda e Fernanda pela força e amizade.

Aos dentistas Rafaela e Marcelo pela realização dos exames clínicos.

Aos funcionários da Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Luis Eduardo (Dudú), Evangelina (Vange), Fátima, Maria do Carmo, Margarethi e Elisabete (Bete), pela ajuda na realização dos estudos.

Aos funcionários da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da USP, Ribeirão Preto, Mário e José Orestes, pela ajuda na produção do gel dentifrício.

À secretaria de pós-graduação, Cláudia, Laura e Sônia pela organização e auxílio.

Aos funcionários da biblioteca da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da UNESP, pela ajuda, disposição e prestatividade.

Ao funcionário Francisco Carlos Rocatelli (Chico), pelas fotos e, aos demais funcionários da SAEPE pelo auxílio.

Aos Professores do Curso de pós-graduação em Ciências Farmacêuticas, UNESP, pelos conhecimentos transmitidos.

Aos colegas do curso de pós-graduação em Ciências Farmacêuticas, UNESP, Andréa, Arnóbio, Bruna, Cínara, Cris, Dany, Gi, Grace, Luana, Marlus, Mara, Nelson, Kélia, Ketylin, Pri, Rubiana, Thalita, Thiago e Tina, pelos tempos de convivência.

Aos voluntários que participaram da realização dos estudos clínicos.

Aos amigos de São Carlos, Andréa, Billy, Tato e Renan, pelo carinho e apoio.

Aos amigos da Igreja Presbiteriana de São Carlos, e a todos os familiares e amigos, que me acompanharam durante essa etapa, pelo carinho, apoio e incentivo.

SUMÁRIO

| | |
|---|-------------|
| LISTA DE FIGURAS..... | X |
| LISTA DE TABELAS..... | XII |
| LISTA DE QUADROS | XIII |
| LISTA DE ABREVIATURAS..... | XIV |
| RESUMO..... | 1 |
| ABSTRACT..... | 2 |
| 1. INTRODUÇÃO..... | 6 |
| 2. OBJETIVOS | 10 |
| 3. REVISÃO DE LITERATURA | 12 |
| 3.1. Espécies vegetais..... | 12 |
| 3.1.1. <i>Nasturtium officinale</i> R. Brown (agrião)..... | 12 |
| 3.1.2. <i>Rosmarinus officinalis</i> L. (alecrim)..... | 13 |
| 3.1.3. <i>Tabebuia impetiginosa</i> (Mart.) Standl. (ipê roxo)..... | 15 |
| 3.1.4. <i>Achillea millefolium</i> L. (mil-folhas) | 16 |
| 3.1.5. <i>Plantago major</i> L. (tanchagem) | 18 |
| 3.2. A estrutura dentária e o periodonto..... | 20 |
| 3.3. Microbiota da cavidade bucal – biofilme bacteriano | 22 |
| 3.4. Formação do biofilme dento-bacteriano | 22 |
| 3.5. Doenças Periodontais - Gengivites | 24 |
| 3.6. Tratamento convencional | 25 |
| 4. MATERIAL E MÉTODOS | 29 |
| 4.1. Material..... | 29 |
| 4.2. Métodos..... | 30 |
| 4.2.1. Preparo do material vegetal..... | 30 |
| 4.2.2. Preparo dos extratos vegetais | 30 |
| 4.2.3. Análise farmacognóstica preliminar | 31 |
| 4.2.4. Determinação do teor de flavonóides totais | 31 |
| 4.2.5. Determinação da umidade em balança com infravermelho | 33 |
| 4.2.6. Estudos de pré-formulação | 33 |

| | |
|--|-----------|
| 4.2.7. Contagem de microrganismos viáveis, pesquisa e identificação de patógeno | 36 |
| 4.2.8. Avaliação da atividade antibacteriana <i>in vitro</i> | 40 |
| 4.2.9. Determinação da atividade antiinflamatória <i>in vivo</i> | 45 |
| 4.2.10. Avaliação da atividade imunológica..... | 46 |
| 4.2.10.1. Determinação da liberação de peróxido de hidrogênio (H ₂ O ₂) | 47 |
| 4.2.10.2. Determinação da liberação de óxido nítrico (NO)..... | 48 |
| 4.2.10.3. Determinação da liberação de TNF- α | 49 |
| 4.2.11. Estudos clínicos..... | 50 |
| 5. RESULTADOS E DISCUSSÃO | 53 |
| 5.1. Caracterização farmacognóstica preliminar | 53 |
| 5.2. Determinação do teor de flavonóides totais | 54 |
| 5.3. Determinação da umidade em balança de infravermelho..... | 56 |
| 5.4. Preparo das formas farmacêuticas..... | 57 |
| 5.4.1. Enxagüatório bucal | 57 |
| 5.4.2. Gel dentífrício | 59 |
| 5.5. Contagem microbiana, pesquisa e identificação de patógeno | 60 |
| 5.6. Avaliação da atividade antibacteriana <i>in vitro</i> | 61 |
| 5.7. Avaliação da atividade antiinflamatória..... | 68 |
| 5.8. Avaliação da atividade imunológica | 69 |
| 5.8.1. Viabilidade celular | 72 |
| 5.8.2. Determinação da liberação de peróxido de hidrogênio (H ₂ O ₂)..... | 76 |
| 5.8.3. Determinação da liberação de óxido nítrico (NO) | 77 |
| 5.8.4. Determinação da liberação de TNF- α | 79 |
| 5.9. Estudos clínicos | 81 |
| 6. CONCLUSÕES..... | 85 |
| 7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS | 87 |
| 8. ANEXOS | 99 |

LISTA DE FIGURAS

| Figura | Página |
|--|---------------|
| 1. <i>Nasturtium officinale</i> (agrião) | 12 |
| 2. <i>Rosmarinus officinalis</i> (alecrim) | 14 |
| 3. <i>Tabebuia impetiginosa</i> (ipê roxo) | 16 |
| 4. <i>Achillea millefolium</i> (mil-folhas)..... | 17 |
| 5. <i>Plantago major</i> (tanchagem)..... | 19 |
| 6. Organização macroscópica dental e do periodonto. | 20 |
| 7. Biofilme bacteriano evidenciado pelo azul de metileno | 23 |
| 8. Esquema da disposição dos discos de papel nas placas de petri | 42 |
| 9. Esquema da disposição dos orifícios nos meios de cultura..... | 43 |
| 10. Esquema de utilização do <i>template</i> | 44 |
| 11. Representação gráfica e valores obtidos para a curva padrão da quercetina..... | 54 |
| 12. Avaliação da atividade antibacteriana pelo teste de difusão em ágar utilizando disco de papel frente à <i>S. aureus</i> e <i>B. subtilis</i> | 62 |
| 13. Avaliação da atividade antibacteriana pelo método de difusão em ágar utilizando <i>hole-plate</i> , frente à <i>S. aureus</i> ; <i>B.subtilis</i> ; <i>P. aeruginosa</i> ; <i>E. coli</i> e <i>E. faecalis</i> | 63 |
| 14. Avaliação da atividade antibacteriana pelo método de difusão em ágar utilizando <i>template</i> frente à <i>S. aureus</i> ; <i>B. subtilis</i> ; <i>P. aeruginosa</i> ; <i>E. coli</i> e <i>E. faecalis</i> | 64 |
| 15. Representação da avaliação da atividade antiinflamatória | 69 |
| 16. Viabilidade de macrófagos periotoneais murinos em presença de diferentes concentrações do extrato hidroalcoólico de <i>N. officinale</i> e <i>T. impetiginosa</i> | 73 |

LISTA DE FIGURAS

| Figura | Página |
|---|---------------|
| 18. Viabilidade de macrófagos peritoneais murinos em presença de diferentes concentrações do extrato hidroalcoólico de <i>R. officinalis</i> (alecrim) e da mistura de extratos | 75 |
| 19. Produção de peróxido de hidrogênio (H ₂ O ₂) em cultura de macrófagos peritoneais em presença dos diferentes extratos | 76 |
| 20. Produção de óxido nítrico (NO) em cultura de macrófagos peritoneais em presença dos diferentes extratos | 77 |
| 21. Produção de fator de necrose tumoral- α (TNF- α) em cultura de macrófagos peritoneais em presença dos diferentes extratos | 79 |
| 22. Ocorrência de placa | 81 |
| 23. Ocorrência de sangramento gengival | 82 |
| 24. Opinião dos participantes quanto à aceitação do gel dentifrício..... | 82 |

LISTA DE TABELAS

| Tabela | Página |
|---|---------------|
| 1. Verificação da solubilidade da mistura de extratos em água destilada. | 33 |
| 2. Efeitos do tensoativo em diferentes concentrações, sobre a mistura de extratos e água | 34 |
| 3. Sacarina e seus efeitos como edulcorante em diferentes concentrações | 34 |
| 4. Flavorizante e seus efeitos em diferentes concentrações | 35 |
| 5. Soluções de corantes | 35 |
| 6. Resultados dos estudos farmacognósticos empregados para as drogas vegetais pulverizadas e para os extratos hidroalcoólicos | 53 |
| 7. Concentração de flavonóides totais presentes nas drogas vegetais pulverizadas e nos extratos hidroalcoólicos | 55 |
| 8. Determinação da umidade | 58 |
| 9. Formulações de enxagüatório bucal | 58 |
| 10. Formulações de gel dentifrício | 59 |
| 11. Halos de inibição obtidos pelo teste de difusão em disco de papel. | 62 |
| 12. Halos de inibição obtidos pelo teste de difusão por <i>hole plate</i> | 63 |
| 13. Halos de inibição obtidos pelo teste de difusão por <i>template</i> | 64 |
| 14. Valores de CIM para as amostras analisadas | 66 |

LISTA DE QUADROS

| Quadro | Página |
|---|---------------|
| 1 Equipamentos utilizados durante o desenvolvimento da pesquisa | 29 |

LISTA DE ABREVIATURAS

Abreviaturas

| | |
|-----------|--|
| ABO | Associação Brasileira de Odontologia |
| ANOVA | Análise de variância |
| ATCC | American type culture collection |
| COX-1 | Cicloxygenase tipo-1 |
| COX-2 | Cicloxygenase tipo-2 |
| ELISA | Enzyme linked immunosorbent assay |
| ERN | Espécies reativas de nitrogênio |
| IG | Índice gengival |
| INCI | International nomenclature cosmetic ingredient |
| IPL | Índice de placa |
| IV | Infravermelho |
| JCE | Junção cimento-esmalte |
| NK | Células <i>natural killer</i> |
| PBS | Solução salina tamponada com fosfato |
| PMNs | Polimorfonucleares |
| PS | Profundidade de sondagem |
| RPMI-1640 | Roswell Park Memorial Institute (meio de cultura – série 1640) |
| RG | Recessão gengival |
| SOD | Superóxido dismutase |
| SS | Sangramento à sondagem |
| UFC | Unidade formadora de colônia |
| USP | United States Pharmacopeia |

RESUMO

A utilização de produtos naturais na medicina popular é milenar e persiste até os dias atuais. Sua abrangência é vasta e engloba fins variados, inclusive em relação à saúde bucal. O controle do biofilme bacteriano dentro das diversas especialidades odontológicas é de grande importância, pois aponta para a prevenção de várias afecções bucais. Quando a remoção mecânica do biofilme é deficiente, podem ocorrer lesões de tecido duro (cáries) e/ou mole (doenças periodontais). A eficácia de plantas medicinais, tanto em dentifrícios como em enxagüatórios bucais, tem sido investigada. Os resultados têm sugerido que os componentes de origem vegetal podem ser empregados como apoio à terapia das doenças periodontais e como profilaxia de rotina. Este trabalho teve como objetivos avaliar a ação biológica de formulações para higiene bucal, contendo, em associação, extratos hidroalcoólicos das espécies vegetais *Nasturtium officinale* (agrião), *Rosmarinus officinalis* (alecrim), *Tabebuia impetiginosa* (ipê roxo), *Achillea millefolium* (mil-folhas) e *Plantago major* (tanchagem). Trabalhos anteriores sugerem possível efeito antiinflamatório e alteração da qualidade do biofilme dento-bacteriano, devido as substâncias ativas desses vegetais. Após os estudos de pré-formulação e obtenção do gel dentifrício e do enxagüatório bucal, foram realizadas avaliações da atividade antibacteriana (frente à *Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis*, *Escherichia coli*, *Enterococcus faecalis* e *Pseudomonas aeruginosa*), atividade antiinflamatória e imunológica, para os extratos vegetais e para as formulações. E foram ainda realizados estudos clínicos iniciais, considerando-se os parâmetros odontológicos para a avaliação do Índice de placa, Índice Gengival, Recessão Gengival e Profundidade de Sondagem. A análise farmacognóstica preliminar caracterizou as drogas vegetais utilizadas. As formulações apresentaram características laboratoriais compatíveis aos quesitos necessários para seu emprego. Os extratos vegetais apresentaram importante atividade antibacteriana e estimulante do sistema imunológico, o que justifica seu emprego em formulações para a higiene bucal com finalidade preventiva. E os estudos clínicos apontam para uma redução no acúmulo do biofilme dento-bacteriano e no sangramento gengival, contribuindo para sua utilização para fins preventivos.

ABSTRACT

The use of natural resources in popular medicine is a millenary practice and it persists until nowadays. This habit is embracing and wide and it conglomerates multiple purposes, included those related to oral health. It's very important to control bacterial film in many odontologic specialties, because this control helps to prevent several oral diseases. When the mechanical removal of the bacterial film is inefficient, there can occur hard tissue lesions (carious lesions) and/or soft tissue lesions (periodontal diseases). The effectiveness of medicinal herbs in dentifrices, as well as in mouthwashes have been investigated. The results have suggested that the herbs components can be utilized as a support in the periodontal diseases therapies and in the routine prophylaxis. It was the purpose of the present study to evaluate the biological action of various formulations to bucal hygiene, containing, in association, hidroalcoholic extracts from the following species: *Nasturtium officinale*, *Rosmarinus officinalis*, *Tabebuia impetiginosa*, *Achillea millefolium* and *Plantago major*. Previous works suggested that there are possible anti-inflammatory effects and an alteration of the bacterial dental film quality, due to the active substances of these herbs. After studying a previous formulation and obtaining the dentifrice and the mouthrinse, it was evaluated the bacterial activity (related to *Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis*, *Escherichia coli*, *Enterococcus faecalis* and *Pseudomonas aeruginosa*), the anti-inflammatory and the immunological activities, for the herbs extracts and for the formulations. And further it was accomplished clinical initial studies, considering the odontologic parameters for the evaluation of the plaque index, gingival index, gingival recession and the periodontal probing depth. The preliminary pharmacognostics analysis has characterized the herb extracts drugs used. The formulations presented laboratorial characteristics consistent to the requirements necessary for their use. The herb extracts showed important antibacterial activity and important stimulant activity for the immunological system, which justify their use in formulations to bucal hygiene with preventive purpose. Also the clinical studies pointed to a reduction in the accumulation of bacterial film and in the gingival bleeding, contributing to its use for preventive purposes.

INTRODUÇÃO

1. INTRODUÇÃO

A utilização de produtos naturais como recurso terapêutico é tão antiga quanto a civilização humana e, por muito tempo, produtos minerais, vegetais e animais constituíram o arsenal terapêutico (EISENBERG et al., 1998). Além disso, pelo seu paralelo com o desenvolvimento da cultura humana, foi e muitas vezes ainda é, acompanhada por significados mágico-religiosos e visões peculiares de saúde e doença (RATES, 2001).

A utilização de plantas medicinais, vem atingindo um público cada vez maior. O retorno à medicina natural ou tradicional requer um posicionamento muito firme dos meios acadêmicos. É fato preocupante hoje, o uso indiscriminado de plantas medicinais sem qualquer conhecimento fitoquímico, farmacológico e toxicológico. Isto vem acontecendo com a maioria das espécies vegetais consumidas pela população (BALLVÉ et al., 1995). A fitoterapia existe principalmente no mercado informal, o que representa grande perigo à saúde da população (BENDAZZOLI, 2000).

A identificação correta das espécies, sua forma de uso e controle de qualidade, também constituem questões a serem resolvidas. A identificação dos vegetais e fitofármacos proporciona aos laboratórios especializados (ervanários, farmácias de manipulação, indústrias de fitoterápicos, estabelecimentos de ensino farmacêutico) condições para efetuarem sua preparação, comercialização ou estudo, com segurança alicerçada em conhecimento científico (BALLVÉ et al., 1995).

O uso de plantas medicinais especialmente na América do Sul, contribui significativamente para os cuidados básicos com a saúde. Para o tratamento de infecções comuns, muitas plantas são utilizadas no Brasil na forma de extrato bruto, infusões ou emplastros, sem nenhuma evidência científica de sua eficácia (PESSINI et al., 2003). Existem casos em que as preparações utilizando o extrato bruto são mais eficazes do que aquelas preparadas com qualquer de seus princípios ativos isoladamente (MATOS, 2000).

A utilização de misturas de extratos vegetais é muito comum na Índia. As preparações contendo extratos brutos de várias espécies vegetais recebem nomes líricos e são utilizadas para o tratamento de doenças em humanos e em animais. Muitos estudos *in vivo* tem demonstrado a eficácia de tais preparações, por suas propriedades antimicrobianas, antidiarréicas, imunomodulatórias, antitumorais, antiinflamatórias, antiarrítmicas, psíquicas, entre outras (COWAN, 1999).

Inegavelmente, as plantas medicinais e os fitoterápicos apresentam papel importante: cerca de 25% dos medicamentos prescritos mundialmente são de origem vegetal (OMS, 1991; RATES, 2001).

Segundo a OMS, **plantas medicinais** são todas aquelas silvestres ou cultivadas, que se utilizam como recurso para prevenir, aliviar, curar ou modificar um processo fisiológico normal ou patológico, ou utilizada como fonte de fármacos e de seus precursores. Enquanto **fitoterápicos** são produtos medicinais acabados e etiquetados, cujos componentes ativos são formados por partes aéreas ou subterrâneas de plantas, ou outro material vegetal, ou combinações destes, em estado bruto ou em formas de preparações vegetais (OMS, 2000; RATES, 2001).

A abrangência da utilização de fitoterápicos e de plantas medicinais é vasta e engloba fins variados, inclusive em relação à saúde bucal. Considerando as doenças periodontais, podemos definí-las como um processo infeccioso que resulta em uma potente resposta inflamatória (MONTEIRO et al., 2002), pois alguns microrganismos, tidos como patógenos periodontais, possuem a capacidade de implantar-se no sulco gengival e invadir o tecido periodontal, por mecanismos que lhes permitem resistir aos fatores de defesa do hospedeiro (RUBIRA, 1993). A susceptibilidade individual e as influências ambientais estão diretamente envolvidas nesse processo, onde as gengivites representam formas mais comuns da doença (FIGUEIREDO et al., 2002).

O controle do biofilme bacteriano dentro das diversas especialidades odontológicas é de grande importância, pois aponta tanto para a prevenção, como para o tratamento, da cárie e de doenças periodontais. Muitos agentes químicos vêm sendo estudados com a finalidade de auxiliar os métodos convencionais de higiene bucal (escovação, fio ou fita dental e palito de dente), entre eles antibióticos, compostos quaternários de amônio, acetato e gluconato de clorexidina (OLIVEIRA et al., 1998).

A clorexidina é hoje, para a Odontologia, um anti-séptico importante no controle do biofilme bacteriano (SEGURA, 1999). No entanto, seu uso freqüente e por longo prazo, apresenta muitos efeitos colaterais (REY, 1999).

A utilização de plantas medicinais, tanto em dentifrícios como em enxagüatórios bucais, tem sido investigada para o tratamento do biofilme bacteriano e gengivites. Os resultados sugerem que os materiais vegetais podem ser empregados como apoio à terapia das doenças periodontais e como profilaxia de rotina (WILLERSHAUSEN et al., 1994).

É comum, em várias culturas, o uso, na medicina popular, de plantas incorporadas em cosmeceuticos, como por exemplo, *Achillea millefolium*, *Rosmarinus officinalis* e

Plantago sp., podendo ser definidos como fitocosmecêuticos. Segundo a European Commission, em 1993, produtos cosméticos foram definidos como qualquer substância ou preparação que entre em contato com as porções externas do corpo humano (epiderme, cabelos, unhas, lábios e órgãos genitais externos) ou dentes e membrana mucosa da cavidade bucal, com a finalidade exclusivamente de limpá-los, perfumá-los, modificar sua aparência ou corrigir odores. Os medicamentos têm sido definidos como produtos para utilização no tratamento e prevenção de doenças, alterando a função fisiológica ou estrutura do organismo. E ainda, surgiu a definição de cosmecêuticos, que abrange produtos que possuem características comuns aos medicamentos e aos cosméticos, embelezam e promovem a saúde (PIERONI et al., 2004).

Os dados sobre a prevalência das doenças periodontais no Brasil são alarmantes, estando próximos de cem por cento (OPPERMANN & KUCHNBECKER, 2001), abrangendo, sobretudo crianças de diferentes regiões. A mudança desta situação implicaria na adoção das práticas individuais de higiene bucal (PEREIRA et al., 1994), onde seria também necessário, o planejamento de programas preventivos e da terapia periodontal básica (MARCANTONIO & SANTOS, 1998).

A utilização dos produtos fitoterápicos, economicamente mais viáveis, mostra-se como uma alternativa interessante, contribuindo para melhorar o acesso da população aos cuidados com a prevenção de doenças periodontais.

Vários outros estudos têm demonstrado a eficácia de plantas, cuja utilização já está difundida entre a população, reforçando a necessidade de se intensificarem os estudos em relação às atividades antiinflamatórias, anti-sépticas, cicatrizantes, analgésicas e imunomoduladoras, quando usadas isoladamente ou em associação. O desenvolvimento de um enxagüatório bucal, bem como o aprimoramento da formulação do gel dentifrício proposto, considerou a realização de vários estudos, a fim de se observar atividades biológicas tendo em vista o aumento de benefícios para a higiene bucal.

OBJETIVOS

2. OBJETIVOS

Este trabalho teve como objetivos:

- conhecer o estado farmacognóstico das drogas vegetais pulverizadas e dos extratos hidroalcoólicos das plantas *Nasturtium officinale* (agrião), *Rosmarinus officinalis* (alecrim), *Tabebuia impetiginosa* (ipê roxo), *Achillea millefolium* (mil-folhas) e *Plantago major* (tanchagem);
 - desenvolver uma formulação de enxagüatório bucal contendo em associação os extratos hidroalcoólicos das mesmas espécies vegetais;
 - conhecer as condições microbiológicas da mistura de extratos e das formulações elaboradas (gel dentifrício e enxagüatório bucal);
 - avaliar as possíveis atividades biológicas (antibacteriana, antiinflamatória e imunomoduladora) dos extratos hidroalcoólicos das espécies *N. officinale*, *R. officinalis*, *T. impetiginosa*, *A. millefolium* e *P. major*: através de métodos de estudos *in vitro* e *in vivo*;
 - avaliar a atividade terapêutica do gel e do enxagüatório bucal aplicada à Periodontia, através de estudos clínicos.
-

REVISÃO DE LITERATURA

3. REVISÃO DE LITERATURA

3.1. Espécies vegetais

3.1.1. *Nasturtium officinale* R. Brown (agrião)

A espécie *Nasturtium officinale* R. Br. (Figura 1), é popularmente conhecida como agrião, agrião-aquático, berro, agrião-da-ponte, cardamia-jontana e pertence à família das Crucíferas. É muito comum nos córregos, sendo também cultivadas nos brejos. Constitui uma planta herbácea, perene, aquática, aromática, de ramos ociosos e verde-avermelhada podendo atingir de 20 a 80 cm de altura. Apresenta raízes adventícias nos nós caulinares, possuindo folhas alternas, pecioladas, esparsas, imparipinadas e folíolos quase sésseis, piriformes e opostos. As flores são brancas e possuem quatro pétalas. É uma planta nativa da Europa e muito usada na medicina tradicional em várias regiões do Brasil (ALMEIDA, 1993; LORENZI & MATOS, 2002).



Figura 1 - *Nasturtium officinale* (agrião).

O agrião é rico em princípios ativos e vitaminas. É considerado na medicina caseira como estimulante dos órgãos digestivos, diurético e vermífugo. Tem sido usado no tratamento da gripe e da bronquite, embora essas propriedades ainda estejam em fase de estudos (ALMEIDA, 1993). Seus principais constituintes químicos são óleos essenciais, iodo, ferro, fosfatos e alguns sais. Seu uso prolongado tem eficaz efeito depurador do sangue e antiescorbuto (MATOS, 2000; LORENZI & MATOS, 2002).

XAVIER et al. (1995) apresentam várias plantas medicinais aplicadas ao uso odontológico, entre as espécies vegetais empregadas para aftas, gengivites e estomatites, encontra-se *N. officinale*, cujo sumo das folhas e talos está indicado na forma de bochechos.

Tem sido descrita a utilização do agrião para o tratamento do bócio, de anemias, tuberculose, diabetes, como antídoto aos efeitos tóxicos da nicotina, para afecções pulmonares, tosses, sardas, manchas escuras na pele, afecções cutâneas, eczemas, acne, aftas e gengivites (PANIZZA, 1998).

NEGRAES (2003) descreve sobre suas propriedades adstringentes, antiinflamatórias, cicatrizantes, descongestionantes e despigmentadoras, tendo sido indicado topicamente para o tratamento de frieiras, feridas e abscessos.

3.1.2. *Rosmarinus officinalis* L. (alecrim)

A espécie *Rosmarinus officinalis* L. (Figura 2) é popularmente conhecida como alecrim-comum, alecrim-de-jardim, erva-da-graça, alecrim-de-cheiro, rosmarinho, rosmarino, rosemary e romero. Pertence à família Lamiaceae, é uma planta pequena, de porte arbustivo lenhoso, ereto, pouco ramificado, de até 1,5m de altura. Apresenta folhas lineares, coriáceas e muito aromáticas. Suas flores são azul claras, pequenas e de aroma forte, muito agradável. A análise fitoquímica registrou para suas folhas, a presença de óleo essencial constituído de uma mistura de componentes voláteis, que é responsável pelo seu odor típico, dentre os quais os principais são cineol, alfa-pineno e cânfora e, entre os compostos não voláteis, o ácido caféico, diterpenos amargos, flavonóides e triterpenóides. É também rico em eucaliptol e alguns ácidos fenólicos (PORTE & GODOY, 2001; MATOS 2000; LORENZI & MATOS, 2002).



Figura 2 - *Rosmarinus officinalis* (alecrim) – Horto de Plantas Medicinais, FCF, UNESP, Araraquara.

Tem sido usado popularmente como carminativo, espasmolítico, sedativo, diurético e antimicrobiano. É indicado ainda, para dispepsia, dores de cabeça, e topicamente, para doenças reumáticas, mialgias e neuralgias (BARNES et al., 2002).

A tintura diluída em álcool 70°GL, é indicada na forma de compressas ou fricções, no tratamento de entorses e contusões (MATOS, 2000).

Possui propriedades adstringentes, analgésicas, antioxidante, anti-séptica, aromática, estimulante da circulação periférica, estimulante do sistema linfático, rejuvenescedora e tônica (NEGRAES, 2003).

É considerado estimulante digestivo, podendo ser utilizado em casos de inapetência, azia, e ainda, distúrbios respiratórios, debilidade cardíaca, cansaço físico e mental, hemorróidas e como cicatrizante (MARTINS, 2000).

Pesquisas recentes em animais também demonstraram que o alecrim pode exercer ação protetora no fígado e estômago contra agentes tóxicos e carcinogênicos. É usado ainda, para o tratamento de estados depressivos, caracterizados por debilidade geral e fraqueza cardiovascular (NEGRAES, 2003).

Segundo Barnes et al. (2002), vários estudos têm confirmado dados importantes sobre atividade antimicrobina, antiviral, anti-espasmódica, anti-convulsivante, anti-tumoral,

antiinflamatória, analgésica, hepatoprotetora, entre outras, através de avaliação *in vitro* e *in vivo* dos extratos aquosos, metanólicos, frações dos mesmos e substâncias isoladas.

Neves et al. (2000) estudaram a atividade antiedematogênica e analgésica do extrato hidroalcoólico bruto de *R. officinalis* (Alecrim) em edema de pata em ratos. O edema foi induzido através de injeção subplantar dos agentes inflamatórios e o efeito analgésico pôde ser avaliado através de contorções abdominais induzidas pelo ácido acético. Os resultados permitiram concluir que o extrato possui atividade antiedematogênica e analgésica.

Outros estudos mostraram que *R. officinalis* possui compostos com significativa ação antioxidante (HARAGUCHI et al., 1995; NAKATANI, 2000).

Dias et al. (2000) confirmaram a ação anti-ulcerogênica do extrato bruto de *R. officinalis*, preparado em etanol 70°GL. De acordo com os resultados encontrados, os autores sugerem que o mecanismo farmacológico dessa atividade não tem relação com óxido nítrico (NO) e prostaglandinas, provavelmente seja devido à presença de compostos antioxidantes.

3.1.3. *Tabebuia impetiginosa* (Mart.) Standl. (ipê roxo)

Pertencente à família Bignoniaceae, a espécie *Tabebuia impetiginosa* (Figura 3) é conhecida popularmente como ipê ou pau-d'arco, adjetivada conforme a cor de suas flores, pau-d'arco roxo, pau-d'arco rosa, ipê roxo, ipê rosa. Constitui uma árvore grande, silvestre, fornecedora de madeira de lei. O tronco tem a casca áspera, que pode ser usada para preparação de fitoterápicos ou para extração do seu principal ativo, o lapachol. Várias espécies de *Tabebuia* contêm, na madeira e na casca, quantidades variáveis desta e outras substâncias parecidas, dotadas de forte atividade antiinflamatória, antimicrobiana, antialérgica, cicatrizante e antitumoral (MATOS, 2000).

Panizza (1998) descreve a indicação do ipê roxo (casca, lenho duro e as flores) para o tratamento de varizes, hemorroidas, úlceras, eczemas, reumatismo, afecções da boca (estomatites, aftas e herpes labial) e ainda, como depurativo, imunoestimulante e antitumoral.

Martins (2000) indica o uso da casca do ipê roxo como adstringente, podendo ser usada em processos infecciosos e inflamatórios.



Figura 3 - *Tabebuia impetiginosa* (ipê roxo) - Campus FCF, UNESP, Araraquara.

Ensaios confirmaram sua ação benéfica para o tratamento local de inflamações da pele e mucosas (gengivas, garganta, vagina, colo do útero e ânus) e várias substâncias isoladas, principalmente o lapachol, têm apresentado, em ensaios farmacológicos, atividade anti-neoplásica, atividade antimicrobiana contra bactérias do gênero *Brucella*, sendo notável sua atividade antiinflamatória, que pode ser comparada à da fenilbutasona (MATOS, 2000; LORENZI & MATOS, 2002).

É descrita ainda separação de dois novos compostos, ciclopentenos dialdeídos, isolados do extrato metanólico da casca de *T. impetiginosa*, que tiveram sua fórmula estrutural determinada. Estes compostos apresentaram atividade antiinflamatória em estudos iniciais (KOYAMA et al., 2000).

3.1.4. *Achillea millefolium* L. (mil-folhas)

Achillea millefolium L. (Figura 4) é uma espécie representativa da riqueza do metabolismo secundário das espécies pertencentes à família Asteraceae, que está amplamente representada na flora brasileira e é muito importante para a fitoterapia. A espécie em questão é conhecida popularmente como mil-folhas, atroveran, erva-de-carpinteiro, mil-folhada, nariz-sangrento, novalgina, pronto-alívio e sanguinária. É uma planta herbácea, perene, ereta,

aromática, entouceirada, de 30-50cm de altura, nativa da Europa e amplamente cultivada em hortas domésticas em quase todo o Brasil. As folhas são compostas, finamente pinadas, de 5-8cm. As flores são brancas, apresentam-se na forma de capítulos, reunidos em uma panícula terminal (JORGE et al., 1999; LORENZI & MATOS, 2002).



Figura 4 - *Achillea millefolium* L. (mil-folhas) - Horto de Plantas Medicinais, FCF, UNESP, Araraquara.

Seus principais constituintes são aminoácidos, ácidos graxos, ácido ascórbico, ácido cafeico, ácido fólico, alcalóides (aquileína, aquiceína), flavonóides, taninos, óleo essencial (limoneno, eucaliptol, monoterpenos, sesquiterpenos, azuleno, camazuleno), açúcares (arabinose, galactose, manitol, maltose, dextrose e glicose) (BARNES et al., 2002).

Possui propriedades diuréticas, antiinflamatórias, antibacterianas, antiespasmódicas, cicatrizantes, antitumorais e anti-hipertensivas. Sendo empregada internamente contra infecções das vias respiratórias, indisposição, dispepsia, diarreia, febres e como auxiliar no tratamento da gota (JORGE et al., 1999; LORENZI & MATOS, 2002). Também está indicada como expectorante, estomáquica e contra distúrbios digestivos, úlceras, cólicas menstruais e amenorréia (MARTINS et al., 2000), e ainda, para gases intestinais, litíase e cólicas renais (PANIZZA, 1998).

São descritas propriedades adstringentes, antiperspirantes, anti-sépticas, despigmentadoras e refrescantes (NEGRAES, 2003). Em uso externo é empregada contra hemorróidas, contusões, doenças de pele e dores musculares (JORGE et al., 1999; LORENZI & MATOS, 2002). Também está indicada para prospatite e fissuras anais (PANIZZA, 1998), para tratamento e prevenção de varizes, para reduzir a transpiração dos pés, para o tratamento de manchas senis nas mãos, lesões e rachaduras da pele. Na forma de bochechos, está indicada para assepsia e tratamento de inflamação da mucosa oral (NEGRAES, 2003).

Dados sobre a atividade antiinflamatória do extrato aquoso de *A. millefolium*, tem sido demonstrados em estudos utilizando camundongos e ratos, através da avaliação do edema de pata induzido por substâncias inflamatórias. E, a atividade antiinflamatória tópica, do referido extrato, também tem sido documentada (BARNES et al., 2002).

Segundo Barnes et al. (2002) o extrato etanólico da planta tem apresentado atividade antimicrobiana contra *Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis*, *Mycobacterium smegmatis*, *Escherichia coli*, *Shigella sonnei* e *Shigella flexneri*. O mesmo autor revela ainda, dados sobre outras propriedades apresentadas pela *A. millefolium* como atividade diurética, anti-espasmódica, anti-pirética, hipotensora entre outras.

Candan et al. (2003) avaliaram a atividade antimicrobiana e antioxidante do extrato metanólico e do óleo essencial de *A. millefolium*. Os resultados mostraram que essas propriedades são mais intensas para o óleo essencial. Entre os microrganismos estudados o extrato metanólico apresentou atividade moderada contra *Clostridium perfringens*, fungos e leveduras.

3.1.5. *Plantago major* L. (tanchagem)

A espécie *Plantago major* L. (Figura 5) é conhecida popularmente como tanchagem, plantagem, tançagem e tranchagem. Pertence à família das Plantaginaceae. Apresenta-se pequena, bienal ou perene, ereta, acaule, podendo atingir cerca de 20 a 30cm de altura. É nativa da Europa e aclimatada em todo o sul do Brasil. Apresenta folhas dispersas em roseta basal, com pecíolo longo e lâmina membranácea e com nervuras bem destacadas (15-25cm de comprimento). As flores são muito pequenas, dispostas em inflorescências espigadas eretas sobre escapo floral de 20-30cm de comprimento. Estas se desenvolvem em frutos que são facilmente colhidos raspando-se entre os dedos por todo escapo. Cresce espontaneamente em terrenos baldios e lavouras perenes (pomares) do sul do Brasil, onde é considerada planta daninha, é contudo, mais conhecida, na medicina caseira (MATOS, 2000; LORENZI & MATOS, 2002).

Segundo Samuelsen (2000), *P. major* contém compostos biologicamente ativos, como polissacarídeos, lipídios, derivados do ácido cafeico, flavonóides, glicosídeos iridóides e terpenóides. Alcalóides e ácidos orgânicos também têm sido verificados. As atividades terapêuticas de extratos de *P. major* têm sido comprovadas, incluindo as antiinflamatórias, analgésicas, antioxidantes, antimicrobianas, imunomoduladoras e anti-ulcerogênicas.



Figura 5 - *Plantago major* (tanchagem) - Horto de Plantas Medicinais, FCF, UNESP, Araraquara.

Apresenta propriedades diuréticas, antidiarréicas, expectorantes, hemostáticas e cicatrizantes, sendo empregada contra infecções das vias respiratórias, bronquite crônica e como auxiliar no tratamento de úlceras pépticas (MATOS, 2000; LORENZI & MATOS, 2002). Segundo Martins et al. (2000) é também utilizada para o tratamento de infecções buço-faríngeas, dérmicas, gastrointestinais e das vias urinárias, como adstringente, emoliente e depurativa. Panizza (1998) descreve seu uso como laxativo (mucilagem), depurativo, contra acnes, cravos e espinhas, picadas de insetos, amigdalites, faringites e traqueítes.

O infuso das folhas de *P. major* é usado como gargarejo no combate às inflamações da boca, garganta e gengivas sangrentas (PANIZZA, 1998; FREITAS et al., 2000; NEGRAES, 2003).

Na forma de óleos e unguentos é utilizada para tratamento de inflamações na pele e de feridas. É também empregada em cremes para queimadura do sol, e compressas para irritações nos olhos (NEGRAES, 2003).

Ringbom et al. (1998), em estudo *in vitro*, observaram o efeito do ácido ursólico isolado de *P. major*. Este mostrou um significativo efeito inibitório seletivo de COX-2, atuando diretamente sobre a enzima.

Flores et al. (2000) demonstraram, ainda, atividade imunomoduladora para o extrato metanólico das folhas de *P. major*, através do estudo de liberação de óxido nítrico e fator de necrose tumoral- α , em macrófagos de ratos. Essas substâncias tiveram sua produção muito aumentada em presença do extrato.

Barnes et al. (2002) apresentam dados sobre a atividade broncodilatadora, hipotensora, antiinflamatória, antimicrobiana, laxativa, hipocolesterolêmica e

hepatoprotetora, através de estudos utilizando modelos animais. E ainda, estudos clínicos revelaram que a associação de *P. major* a outras ervas (*Agrimonia eupatoria*, *Matricaria recutita*, *Mentha piperita* e *Hypericum perforatum*) tem diminuído lesões hemorrágicas em pacientes com gastroduodenites crônicas.

3.2. A estrutura dentária e o periodonto

O dente é definido como uma estrutura branca e dura, implantado na borda alveolar do maxilar e da mandíbula, servindo à preensão e à mastigação dos alimentos. Compreende uma parte que se projeta para fora da gengiva denominada **coroa**, e outra que se articula com as paredes ósseas do alvéolo dentário, a **raiz** (Figura 6). O limite entre ambas é o colo dentário (REY, 1999).

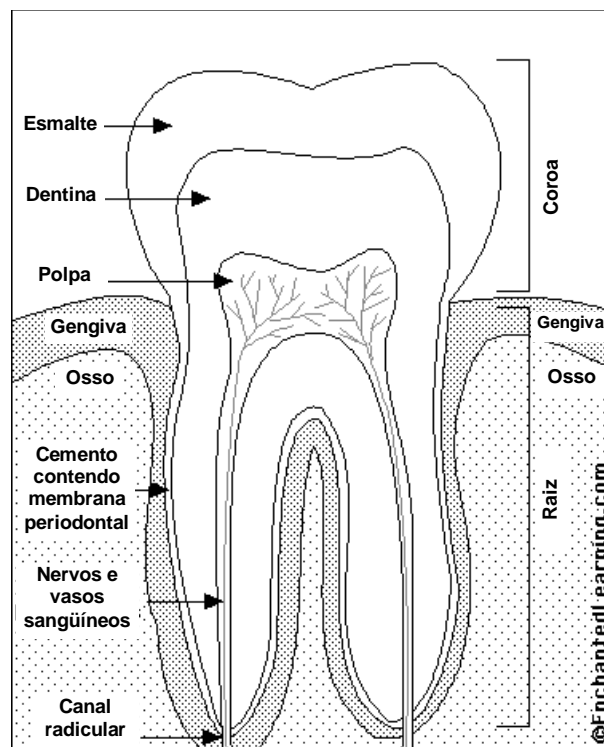


Figura 6 - Organização macroscópica dental e do periodonto (Tooth Anatomy, 2004).

Os dentes são formados por esmalte, dentina e polpa. O esmalte é constituído por tecido duro, em sua maior parte (cerca de 98%) mineralizado (hidroxiapatita- $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$) e, o restante é constituído principalmente por proteína (enamelina) e água. A dentina é formada por cerca de 70% de hidroxiapatita, proteína (colágeno) e água

(WILKINSON & MOORE, 1990). Na coroa, a dentina é recoberta pelo esmalte e na raiz é recoberta pelo cimento (COSTA et al., 2000). A polpa dentária ocupa a porção central de cada dente e constitui-se em tecido conjuntivo frouxo (BHASKAR, 1989). Os dentes são articulados ao alvéolo por ligamentos, que fixam-se no cimento e no osso alveolar (COSTA et al., 2000).

O periodonto (**peri** = *em redor de*, **odontos** = *dente*) compreende os seguintes tecidos: o cimento radicular, o ligamento periodontal, o osso alveolar e a gengiva (BENNION, 2004).

O cimento radicular é o tecido conjuntivo calcificado que cobre a dentina da raiz e no qual os feixes de fibras periodontais são inseridos. É formado por fibras colágenas embebidas por matriz orgânica calcificada. Seu conteúdo inorgânico, a hidroxiapatita, é menor do que o tecido ósseo. As relações cimento com o esmalte na junção cimento-esmalte (CEJ) têm significado clínico (MANSON & ELEY, 1993).

O osso alveolar consiste em dois componentes: o osso alveolar propriamente dito e o processo alveolar. O osso alveolar propriamente dito é contínuo com o processo alveolar e forma a delgada lâmina óssea que está localizada imediatamente lateral ao ligamento periodontal (BENNION, 2004). O processo alveolar é a parte do complexo maxilomandibular que suporta os dentes. É parcialmente dependente do dente e, após sua extração alguma reabsorção ocorre (MANSON & ELEY, 1993).

A raiz do dente é conectada à sua cavidade (formada por osso alveolar) por uma estrutura de tecido conjuntivo que pode ser considerada como um ligamento (ligamento periodontal), cujas fibras colágenas são inseridas nas paredes dos alvéolos. O ligamento periodontal não só conecta o dente ao osso alveolar como também suporta o dente no alvéolo e absorve as cargas que recaem sobre o mesmo. As cargas durante a mastigação, a deglutição e fonação variam consideravelmente em quantidade, frequência, duração e direção, e a estrutura do ligamento geralmente absorve de maneira efetiva, transmitindo-as ao osso de suporte (MANSON & ELEY, 1993).

O quarto componente do periodonto, a **gengiva**, é uma estrutura relacionada com o dente, constituída pela mucosa espessa e rosada que recobre as arcadas alveolares dos maxilares, formada por uma lâmina própria de tecido conjuntivo denso e um epitélio estratificado plano (REY, 1999; BENNION, 2004).

A principal função do periodonto é inserir o dente no tecido ósseo dos maxilares e manter a integridade da superfície da mucosa mastigatória da cavidade bucal. O periodonto, também chamado de **aparelho de inserção** ou **tecido de suporte de dentes**, forma uma

unidade de desenvolvimento biológica e funcional que sofre determinadas alterações com a idade e, além disso, está sujeito a alterações relacionadas com modificações no meio ambiente (LINDHE, 1999; BENNION, 2004).

3.3. Microbiota da cavidade bucal – biofilme bacteriano

As membranas mucosas dos animais são normalmente colonizadas por uma microbiota vasta e diversa, cujas espécies se inter-relacionam constantemente e também com o hospedeiro, competindo pela sua sobrevivência. As bactérias colonizam todas as superfícies de um animal, mas estão particularmente concentradas na cavidade bucal e no trato gastrointestinal inferior, onde alcançam densidades da ordem de cem milhões de bactérias por miligrama de peso de biofilme úmido. Números dessa natureza e magnitude dificultam bastante os procedimentos de isolamento e de taxonomia. Um problema adicional é a flutuação das populações bacterianas, influenciadas por mudanças no meio ambiente (LOESCHE, 1993). A cavidade bucal humana hospeda mais de 400 espécies de bactérias, que já foram isoladas e identificadas (UZEDA, 2002).

De forma geral, as doenças periodontais apresentam como etiologia principal, o biofilme dento-bacteriano, iniciando-se com um quadro de gengivite e progredindo até a periodontite (TREVIZANI, 2002).

3.4. Formação do biofilme dento-bacteriano

O biofilme dento-bacteriano é definido como enduto formado principalmente por restos de alimentos e de secreções mucosas, células epiteliais descamadas e outros materiais orgânicos (glicoproteínas salivares, enzimas microbianas, etc.), além de alguns sais minerais, que ficaram aderidos à superfície dos dentes e se depositam nos espaços interdentários, servindo como meio de cultura para abundante proliferação de bactérias (cujo volume chega a 75% do biofilme), entre as quais *Streptococcus mutans*, que se desenvolve muito em presença de sacarose e outros carboidratos residuais da alimentação. Esta e outras bactérias produzem polímeros extracelulares, a partir dos carboidratos, que contribuem para a adesão do biofilme e constituem substrato nutritivo para o crescimento microbiano quando falta açúcar (REY, 1999).

Alguns autores também utilizam os termos **placa bacteriana** e **massa bacteriana** com a mesma finalidade. O biofilme dental pode ser arbitrariamente classificado como **biofilme supragengival** ou **coronário**, quando se apresenta depositado sobre coroas dentárias, e **biofilme subgengival**, quando se localiza no sulco gengival ou na bolsa periodontal. A necessidade de se destacar o estudo do biofilme dental é justificada por sua participação efetiva no processo de cárie dentária bem como da doença periodontal (UZEDA, 2002).

Os biofilmes bacterianos contribuem, por sua forte produção ácida, para a desmineralização dos dentes, facilitando o ataque enzimático à matriz orgânica e a formação de cáries, assim como participam no desenvolvimento de gengivites e periodontites. As doenças periodontais são caracterizadas como um processo inflamatório dos tecidos que envolvem e sustentam o dente (cimento radicular, ligamento alvéolo-dentário, osso alveolar e gengiva) originando-se, em geral, de uma extensão de infecção bacteriana gengival relacionada com biofilmes dentais ou cálculos (tártaros) (REY, 1999).

A Figura 7 exemplifica o biofilme bacteriano evidenciado pelo azul de metileno, na superfície dentária e nas gengivas.



Figura 7 - Biofilme bacteriano evidenciado pelo azul de metileno (Rúbio, 2004).

A participação microbiana na doença periodontal tem sido considerada em diversos estudos, havendo atualmente um consenso quase unânime de que não existe doença periodontal de natureza inflamatória sem a presença de microrganismos. A principal fonte de agressão às estruturas do periodonto é a complexa microbiota da cavidade bucal (UZEDA, 2002).

Apesar dos estudos revelarem variação na composição microbiana, de um modo geral podemos considerar que a doença periodontal reflete quadros de infecções endógenas mistas resultantes da exacerbação do número e/ou da patogenicidade dos componentes da microbiota do sulco gengival. No entanto, a relação entre os fatores de agressão microbiana e de resistência do hospedeiro resulta uma situação de equilíbrio ou desequilíbrio de forças que expressa o estado sadio da gengiva ou as alterações periodontais (UZEDA, 2002).

3.5. Doenças Periodontais - Gengivites

A expressão **doença periodontal** refere-se a qualquer alteração nas estruturas de suporte do dente, o periodonto. A gengivite é uma inflamação da gengiva, afetando os tecidos moles em volta do dente, sem se estender ao cimento, ligamento periodontal ou osso alveolar. Em contraste a periodontite é um processo inflamatório que afeta a gengiva, o osso alveolar e as estruturas periodontais (MESQUITA, 2001).

As lesões que afetam os tecidos que suportam os dentes têm sido descritas há cerca de 4000 anos. As manifestações dos autores na literatura são de acordo com as diferentes épocas de publicações, podendo definir **doença**: como termo genérico, significando qualquer desvio do estado normal (TODESCAN, 2001).

Os primeiros conceitos de doença periodontal derivaram de observações histopatológicas e, com a evolução da histopatologia, novos conhecimentos surgiram. Os trabalhos científicos em Periodontia podem ser divididos em duas épocas: antes e depois do conceito de biofilme como fator etiológico extrínseco da doença periodontal. Assim, o termo gengivite se refere a uma inflamação do tecido gengival. Ela afeta, virtualmente, toda a população, em algum grau e, como causa primária, tanto da gengivite como da periodontite, está a atividade bacteriana. Mediadores inflamatórios e imunológicos têm sido estudados no fluido gengival para a verificação da progressão da doença (TODESCAN, 2001).

Löe & Theilade (1965), em levantamentos clínicos de curta duração, revelaram que uma gengiva normal não inflamada pode ser notada em pessoas jovens que tem um padrão elevado de higiene bucal. Quando estas pessoas se abstêm da limpeza mecânica dos dentes, os microorganismos começam a colonizar a superfície dentária. Ao fim de poucos dias, podem ser notadas reações inflamatórias na gengiva adjacente. Estas alterações inflamatórias são solucionadas quando medidas corretas de higiene são retomadas.

3.6. Tratamento convencional

Quando se considera a necessidade da prevenção e tratamento da gengivite associada ao biofilme, um fator importante é a relação custo-benefício dos fatores econômico, funcional e bem-estar pessoal do indivíduo, assim como da população como um todo. Vários estudos avaliaram os efeitos de diferentes procedimentos periodontais com o passar do tempo, pelo controle do estado de saúde periodontal e, os resultados de medidas preventivas têm mostrado diferenças. Pôde-se concluir que a combinação de um cuidado próprio regular, melhor e completo pelo indivíduo e o tratamento profissional preventivo, conduzem a uma melhor saúde gengival, diminuição da perda de inserção e manutenção da dentição natural. O controle da higiene bucal em combinação com profilaxias profissionais em intervalos regulares de tempo, geralmente são efetivos na prevenção da transição da gengivite para periodontite. Em pessoas com gengivite crônica, os cuidados devem focar a modificação do comportamento, motivação do indivíduo e eliminação dos fatores locais importantes na retenção do biofilme. É sabido que a manutenção no pós-tratamento e profilaxias repetidas para controlar a inflamação gengival em intervalos regulares adiam ou previnem o reaparecimento da atividade desta no indivíduo (WILSON & KORNMAN, 2001).

Programas que envolvem o indivíduo em um processo que o conduza ao maior interesse próprio e responsabilidade pessoal contribuem para melhorar em longo prazo o alcance de uma limpeza bucal adequada. A escovação dos dentes pode ser efetiva na remoção do biofilme em superfícies vestibulares e linguais, mas dificilmente alcançará o biofilme interdental. Para acompanhar esta variação foram criados outros dispositivos de higiene bucal, estes incluem o fio ou a fita dental e escova interdental (WILSON & KORNMAN, 2001).

A utilização de produtos contendo ativos específicos pode ser associada para auxiliar o tratamento. Existe uma grande variedade de agentes antimicrobianos disponíveis no mercado, cabendo ao profissional uma correta avaliação clínica e escolha do produto adequado de acordo com o quadro apresentado pelo paciente. As soluções à base de clorexidina, triclosan, cloreto de cetilpiridínio ou combinações destes com o fluoreto de sódio são as mais utilizadas. Diversas pesquisas vêm sendo realizadas no campo dos agentes antimicrobianos para uso bucal, demonstrando a necessidade do setor, sobretudo para as inovações. Existem diferentes veículos para a liberação dos agentes antimicrobianos na cavidade bucal; os mais comumente utilizados são: enxaguatórios; dentifrícios; géis; vernizes; gomas de mascar e pastilhas (TORRES et al., 2000). O gluconato de clorexidina em solução a 0,12 %, para bochecho 2 vezes ao dia, reduz de 85 a 95% as bactérias da saliva, o

mesmo acontecendo com o gel a 1% aplicado periodicamente em pacientes com número muito elevado de *S. mutans* e forte propensão à cáries. Mas, seu gosto amargo e a possibilidade (reversível) de manchar os dentes e mucosas têm limitado seu emprego (REY, 1999).

O aumento do biofilme bacteriano é freqüente nos indivíduos que utilizam aparelhos ortodônticos fixos, o que aumenta a susceptibilidade dos mesmos tanto à cárie como à doença periodontal. Nestes pacientes, bochechos de gluconato de clorexidina têm sido indicados como adjuvante ao controle mecânico do biofilme; no entanto, seu uso freqüente e por longo prazo, apresenta efeitos indesejáveis (PUPPIN FILHO & GOLDNER, 2000).

Alguns componentes de óleos essenciais tais como timol, eucaliptol, mentol, e outros, têm sido empregados nos tratamentos de afecções bucais. Na categoria dos enxagüatórios, o exemplo conhecido é o Listerine® (Warner-Lambert). Estudos de curta duração têm mostrado redução do biofilme e da gengivite em média de 35% e os estudos de longa duração têm mostrado uma redução de 25% na formação de biofilme e de 29% de gengivite. Este preparado é uma mistura de timol, mentol, eucaliptol e salicilato de metila. O mecanismo de ação parece estar relacionado à alteração da parede celular bacteriana. Como efeitos adversos pode ser citada a sensação de queimação e o gosto ardido (TORRES et al., 2000).

Muitos fitoterápicos podem exercer inibição no crescimento ou desenvolvimento de bactérias que fazem parte do biofilme dentário humano (SILVA et al., 1995). A eficácia das ervas medicinais, tanto nos cremes dentais como nos enxagüatórios bucais, para o tratamento do biofilme dentário, dos sangramentos gengivais e do pH da saliva, foi investigada por Willershausen et al. (1994). Os estudos mostraram que componentes vegetais reduziram significativamente os índices de biofilme, diminuíram os índices de sangramentos gengivais e elevaram o pH da saliva.

Nascimento et al. (2000) verificaram atividade de extratos vegetais e fitofármacos sobre bactérias resistentes a antibióticos. E concluíram que, estudos sobre o uso terapêutico de plantas devem ser intensificados, principalmente sobre bactérias resistentes a antibióticos, seja em sua ação individual ou em menores concentrações associadas a antibióticos. Entre os extratos estudados, o maior potencial antimicrobiano foi verificado para cravo e jambolão que inibiram, respectivamente 64,2 e 57,1% dos microrganismos, inclusive com maior atividade sobre microrganismos resistentes a antibióticos 83,3%. A associação de antibióticos e extratos vegetais ou fitofármacos mostrou, em alguns casos, sinergismos, possibilitando que os antibióticos já ineficazes apresentassem ação sobre estas bactérias.

Ramacciato (2000) estudou comparativamente as soluções de clorexidina 0,12%, de alho (*Allium sativum*) à 2,5% e óleo de melaleuca (*Melaleuca alternifolia*) à 0,2%. A redução do número de microrganismos nas duas semanas subseqüentes ao uso das soluções foi observada somente com o uso das soluções de alho e óleo de melaleuca. O maior grau de desconforto foi observado com a solução de alho. Os resultados permitem concluir que, embora a solução de alho tenha apresentado efeitos indesejáveis, essa solução, bem como a de óleo de melaleuca, podem ser utilizadas como alternativas à clorexidina.

Alguns exemplos de enxagüatórios bucais contendo ervas medicinais são o Sorriso Herbal® (Kolynos do Brasil) e Malvatricin® (Daudt). Como exemplos de dentifrícios tem-se o Sorriso Herbal® (Kolynos do Brasil) contendo em associação camomila, sálvia, mirra, melaleuca e eucalipto; Sorriso Herbal® com cálcio, contendo erva doce, melissa e hortelã; Sorriso Herbal® com própolis (Kolynos do Brasil) contendo malva, canela e hortelã; e o Parodontax® (GSK) contendo em associação tintura de equinácea, de mirra, de ratânia, de sávia e de camomila (TORRES et al., 2000). Estudos clínicos confirmam a eficácia do dentifrício Parodontax® na redução do biofilme bacteriano, do sangramento gengival e de gengivites (YANKELL et al, 1993).

Outros produtos são comercializados pela Weleda, entre eles géis dentifrícios e enxagüatórios bucais, contendo extratos vegetais (ratânia e calêndula).

No mercado europeu encontram-se disponíveis dentifrícios contendo em associação extratos vegetais como o Homeodent® (contendo *Plantago major*, *Cochlearia armoracia*, *Calendula officinalis* e *Hamamelis virginiana*) e o Homeodent 2® (contendo *Plantago major*, *Cochlearia armoracia*, *Calendula officinalis*, *Hamamelis virginiana* e *Phytolaca decandra*), produzidos pelo Laboratório Francês Boiron.

O esforço para melhorar a saúde bucal deve assentar-se em melhoria da qualidade de vida, o propósito da prevenção é bastante amplo e por isso destacam-se os produtos que contribuem no processo (LARA & PANZERI, 1996).

MATERIAL E MÉTODOS

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1. Material

O Quadro 1 apresenta os equipamentos utilizados para a realização dos estudos.

Quadro 1 - Equipamentos utilizados durante o desenvolvimento da pesquisa

| EQUIPAMENTOS | FABRICANTE / FORNECEDOR |
|------------------------------------|-------------------------|
| Autoclave | PHOENIX |
| Balança analítica e semi-analítica | GEHAKA |
| Banho-maria | FANEM |
| Batedeira a vácuo | AMADIO |
| Batedeira simples | MARCONI |
| Bomba de vácuo | FANEM |
| Câmara hemocitométrica de Neubauer | BOECO |
| Capela de exaustão | BRASLAB |
| Capela de fluxo laminar | VECO |
| Centrífuga Mod. Universal 32R | UNISCIENCE |
| Centrífuga Mod. 205N | FANEM |
| Contador de colônias | PHOENIX |
| Espectrofotômetro de Eliza | UNISCIENCE |
| Espectrofotômetro UV / Visível | FEMTO |
| Espessímetro | MITUTOYO |
| Estufa | SOC. FABBE LTDA |
| Estufa bacteriológica | FANEM |
| Estufa bacteriológica – Digital | ODONTOBRÁS |
| Estufa com CO ₂ | FORMA SCIENTIFIC |
| Lavadora ultra-sônica | UNIQUE |
| Luz UV | PRODICIL |
| Manta de aquecimento | MARCHESONI |
| Máquina para lacrar bisnagas | LUFERCO |
| Medidor de pH | MARCONI |
| Moinho de Bolas | SOC. FABBE |
| Turbolizador | SKYMSEM |
| <i>Vortex</i> | HEIDOLPH |

4.2. Métodos

4.2.1. Preparo do material vegetal

As espécies vegetais utilizadas foram coletadas entre os meses de abril e junho de 2003 e identificadas no Laboratório de Botânica da Faculdade de Ciências Farmacêuticas, UNESP, Campus de Araraquara. O material vegetal utilizado no preparo dos extratos hidroalcoólicos, foi colhido no Horto de Plantas Medicinais e Tóxicas da mesma unidade, exceto *T. impetiginosa* (ipê roxo) que foi colhida no Campus da UNESP de Araraquara e o *N. officinale* (agrião), que foi adquirido no comércio. Foram utilizados órgãos aéreos para as cinco espécies referidas, no caso da *T. impetiginosa* (ipê roxo), as flores, no caso de *N. officinale* (agrião), os ramos e, no caso dos demais, as folhas.

O material fresco de *P. major* (tanchagem), depois de colhido, foi submetido à lavagem e posterior imersão em solução de hipoclorito de sódio 0,01%, a fim de promover sua desinfecção. Após este procedimento, o material vegetal foi submetido à secagem prévia, por aproximadamente 24 horas, à temperatura ambiente, sobre bancadas, previamente limpas, sanitizadas e revestidas com papel absorvente, seguindo-se a secagem, em estufa de circulação de ar, a 40°C, por 72 horas. Após este processo, a planta foi colocada em moinho de bolas, por 3 horas, para se obter a granulometria correspondente a classificação de pó grosso de acordo com a United States Pharmacopeia 23 (1995), que estabelece um tamanho médio de partícula de 0,84mm. O material fresco de cada uma das outras espécies vegetais empregadas neste estudo (*N. officinale* (agrião), *R. officinalis* (alecrim), *T. impetiginosa* (ipê roxo) e *A. millefolium* (mil-folhas)), foi submetido às mesmas etapas para *P. major*.

4.2.2. Preparo dos extratos vegetais

Os extratos vegetais foram preparados tomando-se 10g das respectivas drogas vegetais secas e pulverizadas (*P. major* (ramos), *N. officinale* (ramos), *R. officinalis* (folhas), *T. impetiginosa* (flores) ou *A. millefolium* (ramos)), em separado e adicionando-se 90g de etanol 70° GL. Procedeu-se à extração por turbólise, com tempo de agitação de 10 minutos, divididos em intervalos de 5 minutos, entre os quais, um período de descanso de 5 minutos. Durante o processo de preparo do extrato a temperatura foi controlada com o auxílio de um

termômetro de maneira a garantir que não ultrapassasse 40°C. Em seguida, procederam-se duas filtrações a vácuo.

Ao longo do desenvolvimento do trabalho foram preparados mais extratos de acordo com o requerido para a realização dos estudos, empregando-se os mesmos lotes de drogas vegetais.

Os extratos hidroalcoólicos obtidos foram acondicionados em frascos de vidro âmbar, sob refrigeração a 4°C, para serem empregados na realização dos ensaios previstos.

A mistura de extratos foi preparada tomando-se 4g do extrato hidroalcoólico de *P. major* (tanchagem) e 2g dos demais extratos (*N. officinale* (agrião), *R. officinalis* (alecrim), *T. impetiginosa* (ipê roxo) e *A. millefolium* (mil-folhas), totalizando-se as seguintes proporções: 33,33% para *P. major* e 16,67% para os demais.

4.2.3. Análise farmacognóstica preliminar

As análises farmacognósticas foram realizadas com o objetivo de se verificar a presença de compostos de interesse nas diferentes espécies. Os testes realizados constaram da identificação de flavonóides, alcalóides, saponinas, antraquinonas e taninos, seguindo-se as metodologias validadas para cada grupo. Foram realizadas análises tanto para as drogas vegetais pulverizadas, como para os extratos hidroalcoólicos, incluindo a mistura de extratos previamente obtida (CORTEZ et al., 2001).

Os testes para flavonóides consistiram das reações de Shinoda, de Taubock e com cloreto de alumínio. A presença de saponinas foi verificada através do testes de espuma persistente. Já para a presença de taninos foram realizadas as reações com gelatina, com sais de ferro e com acetato de chumbo. Para a pesquisa de alcalóides foram realizados os testes com os reativos de Dragendorff, Valser-Mayer, Wagner e Bertrand. E para antraquinonas foi realizada a Reação de Bornträger e da microsublimação (CORTEZ et al., 2001)

4.2.4. Determinação do teor de flavonóides totais

Para a determinação do teor de flavonóides totais em relação a quercetina, foi utilizada a metodologia proposta por Dowd (1959) modificada, referente ao doseamento de quercetina por espectrofotometria e complexação com cloreto de alumínio. Inicialmente, foi

preparada uma curva analítica padrão, relacionando várias concentrações (0,0; 0,2; 0,4; 0,6; 0,8; 1,0; 1,2; 1,4; 1,6; 1,8 e 2,0 ppm) de padrão secundário de quercetina e os valores de absorvância encontrados. As soluções foram preparadas em balões volumétricos de 10,0mL, onde foram acrescentados 0,4mL de solução de cloreto de alumínio a 2,0% (p/v); 4,0mL de acetato de etila e completou-se o volume utilizando solução de ácido acético a 5% (v/v) em metanol. As amostras foram preparadas em triplicata.

Foram pesados exatamente 0,4g da amostra de cada droga vegetal seca e pulverizada. Cada amostra foi transferida para balão de fundo redondo de 100,0mL e adicionou-se 1,0mL de solução de hexametilenotetramina (urotropina) a 0,5% (p/p), 20mL de acetona e 2mL de ácido clorídrico concentrado. O balão foi submetido ao aquecimento sob refluxo por trinta minutos. A mistura foi filtrada para um balão volumétrico de 100,0mL através de funil e chumaço de algodão. O resíduo da droga vegetal e o algodão foram lavados com duas porções de 20,0mL de acetona, aquecendo-se até a fervura sob refluxo por 10 minutos, cada lavagem. Após resfriamento à temperatura ambiente, procedeu-se nova filtração, através de algodão para o balão volumétrico, completando-se o volume com acetona. Exatamente 20,0mL da fração acetônica foram transferidos para funil de separação, tratados com 20,0mL de água e, em seguida, extraídos com 15,0mL de acetato de etila, repetindo-se a operação por três vezes, com porções de 10,0mL de acetato de etila. As fases de acetato de etila foram reunidas e lavadas, em funil de separação, com duas porções de 50mL de água. A seguir, à fração acetato de etila acrescentou-se sulfato de sódio anidro e procedeu-se nova filtração, transferindo-se o conteúdo para um balão de 50,0mL, completando-se o volume com o mesmo solvente. Exatamente 10,0mL dessa fração foram colocados em balão volumétrico de 25,0mL, acrescentando-se 1,0mL da solução de cloreto de alumínio a 2% (p/v) e completando-se com solução metanólica de ácido acético a 5% (v/v). Simultaneamente, outra porção de 10,0mL da fração de acetato de etila foram diluídos em balão volumétrico de 25,0mL, com solução metanólica de ácido acético a 5% (v/v), sem o acréscimo da solução de cloreto de alumínio, obtendo-se assim a solução de compensação. Após trinta minutos, procedeu-se a leitura em espectrofotômetro em 425nm (referente a absorção da quercetina). As amostras foram preparadas em triplicata.

A determinação do teor de flavonóides totais para os extratos foi determinada da mesma maneira como descrito para as drogas vegetais secas e pulverizadas, contudo foram utilizados 4,0mL de extrato hidroalcoólico. Esse volume foi pesado e o valor encontrado foi considerado para a realização dos cálculos. As amostras também foram preparadas em triplicata.

Os tubos foram preparados em triplicata e analisados por observação visual, em mesa iluminada.

Novos testes foram realizados utilizando-se um tensoativo, o monoleato de polioxietileno sorbitano (INCI name: *Polysorbate 80*), também em diferentes proporções (Tabela 2).

Tabela 2 - Efeitos do tensoativo em diferentes concentrações, sobre a mistura de extratos e água

| Tubos de ensaio | I | II | III | IV | V | VI | VII | VII | IX | X |
|--|----------|-----------|------------|-----------|----------|-----------|------------|------------|-----------|----------|
| Monoleato de Polioxietileno sorbitano (g) | 0,100 | 0,075 | 0,070 | 0,060 | 0,050 | 0,040 | 0,035 | 0,030 | 0,025 | 0,020 |
| Mistura de extratos Hidroalcoólicos (g) | 1,2 | 1,2 | 1,2 | 1,2 | 1,2 | 1,2 | 1,2 | 1,2 | 1,2 | 1,2 |
| Água destilada q.s.p. (g) | 10 | 10 | 10 | 10 | 10 | 10 | 10 | 10 | 10 | 10 |

Os tubos foram preparados em triplicata e observados visualmente, em mesa iluminada.

Foram realizados ainda testes para se definir a quantidade adequada de edulcorante a ser utilizada. Para tanto foi previamente escolhida a sacarina sódica (INCI name: *Sodium Saccharin*), mais comumente utilizada nestas formulações, podendo estar associada ou não, a outros edulcorantes (Tabela 3).

Tabela 3 - Sacarina e seus efeitos como edulcorante, em diferentes concentrações

| Béquer de 100mL | I | II | III |
|--|----------|-----------|------------|
| Sacarina sódica (g) | 0,025 | 0,050 | 0,075 |
| Monoleato de polioxietileno sorbitano (g) | 0,50 | 0,50 | 0,50 |
| Mistura de extratos hidroalcoólicos (g) | 12 | 12 | 12 |
| Água destilada (g) q.s.p. | 100 | 100 | 100 |

O flavorizante escolhido, aroma de *peppermint* (INCI name: *Mentha piperita oil*), foi testado em diferentes concentrações, segundo mostrado abaixo (Tabela 4):

Tabela 4 - Flavorizante e seus efeitos em diferentes concentrações

| Béquer de 100mL | I | II | III | IV | V |
|---|-------|-------|-------|-------|-------|
| Aroma de <i>peppermint</i> (g) | 0,05 | 0,06 | 0,07 | 0,1 | 0,2 |
| Sacarina sódica (g) | 0,025 | 0,025 | 0,025 | 0,025 | 0,025 |
| Monoleato de polioxietileno sorbitano (g) | 0,50 | 0,50 | 0,50 | 0,50 | 0,50 |
| Mistura de extratos hidroalcoólicos (g) | 12 | 12 | 12 | 12 | 12 |
| Água destilada (g) q.s.p. | 100 | 100 | 100 | 100 | 100 |

Com o intuito de garantir a conservação do produto foi utilizado como preservante o metilparabeno (INCI name: *Methylparaben*), na concentração de 0,1%.

Foi utilizada ainda, 0,1% de uma solução de corante verde, previamente preparada (1% p/p em água destilada), com o objetivo de melhorar o aspecto do enxagüatório bucal obtido, contribuindo para melhorar a aceitação do produto.

Para a elaboração do enxagüatório bucal preparado sem a presença de extratos vegetais, os mesmos foram substituídos por etanol 70°GL. A concentração do restante dos componentes da formulação foi mantida, acrescentando-se ainda uma solução de corantes, previamente preparada como descrito abaixo (Tabela 5) para que a cor do produto contendo extratos vegetais, pudesse ser reproduzida no produto sem extratos vegetais.

Tabela 5 - Soluções de corantes

| Solução A | | Solução B | | Solução C | |
|-----------------------|---------|-----------------------|---------|-----------------------|---------|
| Corante | % (p/p) | Corante | % (p/p) | Corante | % (p/p) |
| Amarelo | 1 | Verde | 1 | Vermelho | 1 |
| Água destilada q.s.p. | 100 | Água destilada q.s.p. | 100 | Água destilada q.s.p. | 100 |

A solução de corante utilizada no produto sem extratos vegetais foi obtida tomando-se 5,0mL da Solução A, 4,0mL da Solução B e 3,0mL da Solução C. A solução final obtida foi utilizada na concentração de 0,24%. Esta concentração foi determinada por comparação visual, à medida que a solução de corantes era acrescentada sobre o produto sem extratos vegetais, em proveta de 100mL.

4.2.6.2. Gel dentifrício

A formulação base do gel dentifrício contendo os extratos vegetais hidroalcoólicos, proposta por Trevizani (2002) foi utilizada como base. A mesma foi elaborada através de estudos de pré-formulação, também no Laboratório de Cosmetologia da Faculdade de Ciências Farmacêuticas, UNESP, Campus de Araraquara. Contudo foram propostas algumas modificações: a concentração da mistura de extratos vegetais, proposta por Trevizani (2002) de 5,0% (p/p), foi aumentada para 12,0% (p/p); e foi retirado da formulação proposta por Trevizani (2002), o componente fluoreto de sódio.

O gel dentifrício teve sua manipulação sob vácuo, realizada no Laboratório de Farmacotécnica, da Faculdade de Ciências Farmacêuticas, da Universidade de São Paulo, Campus de Ribeirão Preto. É sabido que a presença do lauril sulfato de sódio favorece o aparecimento de bolhas durante o processo de manipulação manual, a fim de se obter uma formulação ausente de bolhas e com melhor aparência, esse processo foi realizado mecanicamente, sob vácuo.

Foi realizada a verificação do pH em pHmetro utilizando-se eletrodo de vidro. Procederam-se às atividades de determinação de pH, diretamente sobre o produto obtido, tomando-se 20,0g de amostra a temperatura ambiente (25°C). Este ensaio foi realizado em triplicata, sendo o resultado final a média dos valores encontrados.

Para a obtenção do gel dentifrício sem extratos vegetais, foi utilizada a mesma formulação básica citada anteriormente, contudo a mistura de extratos foi substituída por etanol 70°GL. Para a obtenção de cor semelhante à do produto contendo extratos vegetais, foi utilizada a solução de corantes descrita para a preparação do enxagüatório bucal, porém na concentração de 0,12%.

4.2.7. Contagem de microrganismos viáveis, pesquisa e identificação de patógeno

Os testes de contagem microbiana, pesquisa e identificação de patógenos, foram realizados no Laboratório de Controle de Qualidade Microbiológico, da Faculdade de Ciências Farmacêuticas, UNESP, Campus de Araraquara.

O teste foi realizado para as amostras de gel dentifrício contendo extratos vegetais e o produto sem extratos; enxagüatório bucal contendo extratos vegetais e o produto sem extratos e para a mistura de extratos hidroalcoólicos das espécies vegetais. Todo o

procedimento foi executado sob técnicas assépticas, incluindo a utilização de capela de fluxo laminar.

A primeira preocupação ao se preparar a amostra consistiu na verificação da atividade antimicrobiana do produto devido à presença de conservantes. Estes foram inativados com substâncias adequadas, conforme sua natureza química, como neste caso as formulações possuíam um derivado de fenol (*Methylparaben*), utilizou-se 1% de *Polysorbate 80* no diluente inicial (PINTO et al., 2003).

Outro cuidado importante, para não impedir o crescimento microbiano, foi o ajuste do pH do produto diluído para a faixa da neutralidade (tampão fosfato pH = 7,2) (PINTO et al., 2003).

A homogeneização das amostras foi realizada em homogeneizadores mecânicos (não de altíssima velocidade, incompatíveis com a estrutura celular), podendo ser também manual. Todas as operações foram empregadas de forma a possibilitar a contagem e pesquisa de microrganismos ao ensaio (PINTO et al., 2003).

As diluições foram preparadas a partir das amostras originais homogeneizadas, a cada passo, seguindo os cuidados de assepsia e homogeneização. As amostras foram preparadas da seguinte maneira: tomaram-se 10,0g dos géis dentifrícios (com e sem extratos) e 10,0mL dos enxagüatórios (com e sem extratos) e 10,0mL da mistura de extratos, transferindo-os para erlenmeyers contendo 90mL de solução tampão fosfato estéril, de pH=7,2.

Para a contagem de bactérias, após a agitação destes recipientes por 10 minutos em mesa agitadora, tomou-se 1mL de cada amostra e transferiu-se para placas de petri (100 x 20mm), sobre as quais foram vertidos 15-20 mL de Ágar Caseína-Soja, liquefeito a 45-46°C, previamente esterilizado. Homogeneizaram-se as alíquotas (meio de cultura e amostra) empregando-se movimentos suaves em sentido horário e anti-horário, alternadamente. As amostras foram diluídas de maneira que o número de colônias não ultrapassasse 300 UFC/placa. Após a solidificação do meio de cultura (aproximadamente 20 minutos), as placas foram incubadas, em posição invertida a $36^{\circ} \pm 1^{\circ}\text{C}$ durante 48 horas, as leituras foram realizadas após 24 e 48 horas de incubação. O número de colônias desenvolvidas foi contado com o auxílio de um contador de colônias (com iluminação artificial controlada, lupa apropriada e registrador). Este teste foi realizado em triplicata e os valores apresentados correspondem as médias obtidas.

Para a contagem de fungos e leveduras, da mesma maneira, foram empregadas placas de petri (100 x 20mm), sobre as quais foi adicionado 1mL de cada amostra

(previamente diluída em solução tampão) 15-20mL de Ágar Sabouraud-Dextrose liquefeito a 45-46°C, esterilizado. Diluiu-se a amostra de maneira que o número de colônias não ultrapassasse 300UFC/ placa. As placas foram incubadas a 25°C durante 7 dias e, as leituras foram realizadas após o período de incubação. O número de colônias desenvolvidas foi contado com o auxílio de um contador de colônias (com iluminação artificial controlada, lupa apropriada e, contador registrador). Este teste foi realizado em triplicata e os valores apresentados representam a média aritmética obtida.

O número de microrganismos foi calculado por grama ou mililitro para cada amostra, multiplicando-se o número de colônias da placa pela diluição empregada. Os resultados foram expressos como unidades formadoras de colônias (UFC/g ou mL).

Conforme algumas orientações farmacopéicas e citações técnicas mais aceitas, os microrganismos a serem pesquisados devido à sua presença indesejável nas formulações farmacêuticas ou cosméticas são: *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* e *Salmonella sp* (PINTO et al., 2003).

As tomadas de amostra foram da ordem de 10g (ou mL), quantidade que foi simultaneamente usada para se promover o crescimento para pesquisa de *E. coli* e *Salmonella sp.*, em 90mL de caldo lactosado. Igual quantidade das amostra foi empregada também simultaneamente, para crescimento de *S. aureus* e *P. aeruginosa*, em caldo caseína-soja (caldo peptonado). A incubação foi feita a $36^{\circ} \pm 1^{\circ}\text{C}$, durante 24 a 48 horas.

Particularmente para *Salmonella sp.*, procedeu-se também enriquecimento em meio seletivo, tomando-se volumes de 10mL da suspensão resultante do crescimento não seletivo, para os caldos tetrionato e selenito-cistina, em volumes de 90mL, então incubados em estufa, durante 24 horas a $36^{\circ} \pm 1^{\circ}\text{C}$ (PINTO et al., 2003).

Após a incubação, (para crescimento não seletivo e seletivo no caso de *Salmonella sp.*) alíquotas de 1,0mL foram transferidas para meios de cultura para isolamento e diferenciação, visando identificar o microrganismo.

A) *Pseudomonas aeruginosa*

Para a pesquisa e identificação deste patógeno foi utilizado o Ágar Cetrimida (onde as colônias mostram-se esverdeadas, com fluorescência). Empregou-se o brometo de sal de amônio quaternário de cetiltrimetilamônio (cetrimida) como agente seletivo, que possui notável poder inibitório sobre microrganismos distintos da *P. aeruginosa*. Foi transferido

1mL de amostra em meio de enriquecimento (caldo peptonado) para placas de petri contendo Ágar Cetrimida. E procedeu-se a incubação a $36^{\circ} \pm 1^{\circ}\text{C}$ por 24 horas (PINTO et al., 2003).

B) *Staphylococcus aureus*

Para a pesquisa e identificação deste patógeno foi utilizado o Agar Vogel-Johnson (onde as colônias mostram-se de cor negra brilhante, com um halo amarelo). Trata-se de um meio de cultura adequado para a investigação de estafilococos manitol-positivos. Considerando a capacidade de redução do telurito e a fermentação do manitol deste grupo de microrganismos, pode-se adotá-lo para o seu isolamento. A produção de ácido a partir de manitol é responsável pelo halo amarelo característico (PINTO et al., 2003).

Foi transferido 1mL de amostra em meio de enriquecimento (caldo peptonado) para placas de petri contendo Ágar de Vogel-Johnson. As placas foram incubadas a $36^{\circ} \pm 1^{\circ}\text{C}$ por 24 horas (PINTO et al., 2003).

C) *Salmonella* sp.

Foram utilizados os meios de enriquecimento seletivos: caldo selenito-cistina e caldo tetracionato, para o preparo das amostras.

Como meio de isolamento foram utilizados o Ágar Verde-Brilhante (onde as colônias apresentam-se transparentes) e o Ágar Sulfito de Bismuto (onde as colônias mostram-se negras ou esverdeada). É possível a redução dos íons bismuto a bismuto metálico, acarretando o surgimento de brilho na periferia da colônia (PINTO et al., 2003). O Ágar Xilose-Lisina-Desoxicolato (XLD) também foi utilizado (onde as colônias mostram-se vermelhas, com núcleo negro). Devido à sua composição e, particularmente, graças ao conteúdo reduzido de desoxicolato, é adequado para demonstrar a presença de *Salmonella* sp. Após o enriquecimento seletivo, foram transferidas alíquotas de 1mL para placas de petri contendo Ágar Verde-Brilhante (no qual as colônias de *Salmonella* sp. são razoavelmente grandes), placas contendo Ágar XLD e placas contendo Ágar Bismuto-Sulfito. As placas foram incubadas por 24 horas a $36^{\circ} \pm 1^{\circ}\text{C}$ (PINTO et al., 2003).

D) *Escherichia coli*

Foi utilizado o Ágar Mac Conkey (onde as colônias apresentam-se cor vermelho-tijolo a púrpura, com halo de precipitação de bile) (PINTO et al., 2003).

O Ágar Eosina-Azul de Metileno (EMB) também foi utilizado (onde as colônias mostram-se vermelho-escuras, com brilho metálico). Este meio é usualmente empregado na identificação de *E. coli* que, graças a sua interação com a eosina e o azul de metileno, apresentam colônias típicas com brilho metálico esverdeado escuro, inconfundíveis (PINTO et al., 2003).

Foi transferido 1mL de amostra em meio de enriquecimento meio não-seletivo (caldo lactosado) para tubos contendo caldo tetracionato, selenito-cistina e uma placa de petri contendo Ágar Mac Conkey. Os tubos e as placas preparados, foram incubados a $36 \pm 1^\circ\text{C}$ por 24 horas. Foi realizado ainda um teste de confirmação, transferindo-se com alça metálica, parte do crescimento bacteriano referente ao teste anterior, para placas de petri contendo Ágar EBM, que também foram incubadas a $36 \pm 1^\circ\text{C}$ por 24 horas (PINTO et al., 2003).

4.2.8. Avaliação da atividade antibacteriana *in vitro*

A fim de se avaliar a atividade antibacteriana das formulações desenvolvidas (gel dentifrício e enxagüatório bucal), bem como da mistura de extratos hidroalcoólicos (*P. major* (tanchagem), *N. officinale* (agrião), *R. officinalis* (alecrim), *T. impetiginosa* (ipê roxo), e *A. millefolium* (mil-folhas)) foram realizados ensaios no Laboratório de Microbiologia Clínica, da Faculdade de Ciências Farmacêuticas, UNESP, Campus de Araraquara, frente à bactérias Gram-negativas e Gram-positivas. Inicialmente a referida atividade foi verificada pelos métodos de difusão em ágar (por disco de papel, por *hole-plate* e por *template*). Para tanto foram utilizados os seguintes microrganismos: *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC nº 27853), *Escherichia coli* (ATCC nº 25922), *Staphylococcus aureus* (ATCC nº 25923), *Bacillus subtilis* (ATCC nº 6633) e *Enterococcus faecalis* (ATCC nº 10541). Os padrões foram obtidos a partir de culturas de microrganismos ensaiados, cultivados em Caldo Triptona Soja (TSB) e incubados por 18-24 horas a $36 \pm 1^\circ\text{C}$. A partir dessas suspensões foram preparadas suspensões padronizadas com turvação equivalente a concentração de 24×10^8 UFC/mL, quando comparada ao padrão de ácido sulfúrico/cloreto de bário, tubo nº 8 da escala de Mc Farland.

4.2.8.1. Teste de difusão em ágar, utilizando disco de papel

Os discos utilizados foram preparados a partir de papel Wathman n° 1, com 15mm de diâmetro e capacidade de absorção de cerca de 50µL de amostra. Os mesmos foram embebidos com as amostras por cinco vezes (com intervalo para secagem entre cada aplicação) antes de serem distribuídos sobre os meios.

Foram avaliadas as amostras de gel dentifrício contendo extratos vegetais e sem extratos, enxaguatório bucal contendo extratos vegetais e sem extratos e, a mistura de extratos vegetais.

As amostras de gel dentifrício foram preparadas a partir de 2g do produto e 10,0mL de solução salina, procedendo-se à eluição e possível solubilização das substâncias antimicrobianas com o auxílio de agitador. A seguir, a suspensão foi centrifugada por 15 minutos a 400 x g, utilizando-se o sobrenadante para a verificação da atividade antibacteriana.

Para as amostras de enxaguatório bucal contendo extratos vegetais e sem extratos e, para a mistura de extratos vegetais, foram tomados 30mL, os quais foram submetidos à secagem à uma temperatura que não ultrapassou 40°C, durante aproximadamente 24 horas. O resíduo obtido foi ressuspenso em 3,0mL de etanol 70°GL e utilizado para a realização dos estudos.

Foram distribuídos 20mL do meio de cultura, Ágar Triptona Soja – TSA (Difco) sobre cada placa (90 x 15mm) para a realização do teste. As suspensões dos microrganismos foram semeadas sobre a superfície dos meios em três direções, com o auxílio de um *swab* estéril, de maneira a cobrir toda placa. Cada placa foi dividida em 5 campos onde foram distribuídos os discos (Figura 8).

Procedeu-se à distribuição sobre as placas, dos 5 discos de papel embebidos com as amostras. Foi utilizado um disco central embebido com o solvente para comparação dos resultados (controle) e as placas foram incubadas em estufa a 36± 1°C, por 48 horas. As leituras foram efetuadas após a incubação (MURRAY, 2003).

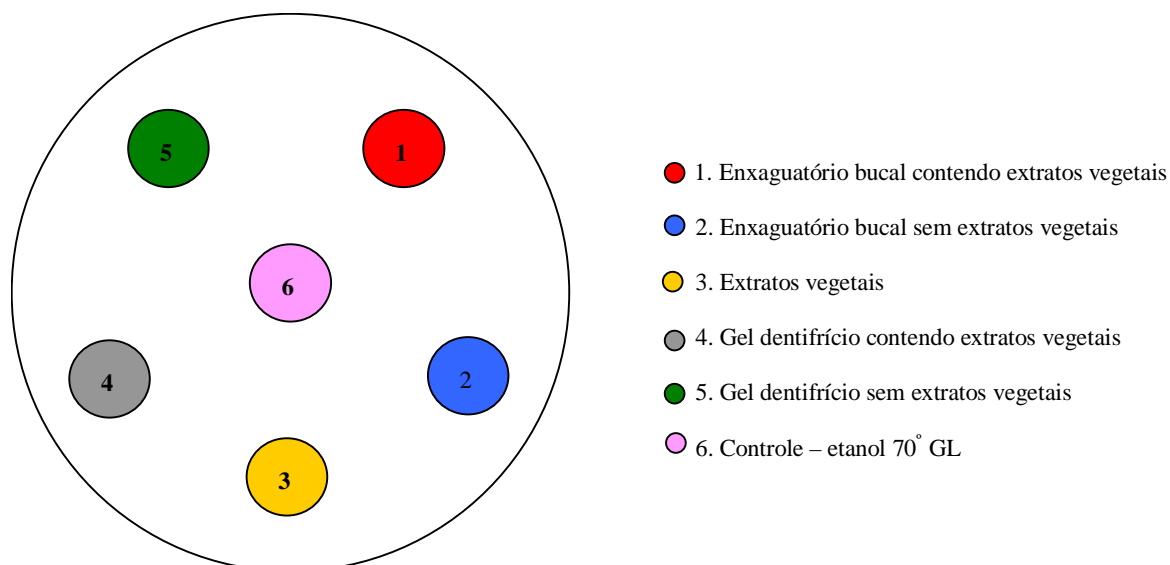


Figura 8 - Esquema da disposição dos discos de papel nas placas de petri.

4.2.8.2. Teste de difusão em ágar, utilizando *hole plate*

Para a realização dos estudos aplicando-se o teste de difusão em ágar por orifício no próprio meio de cultura (*hole plate*), foram utilizadas as mesmas espécies de bactérias (*P. aeruginosa*, *E. coli*, *S. aureus*, *B. subtilis*, *E. faecalis*).

As placas foram preparadas da mesma maneira como descrito no item anterior, foram distribuídos 20mL do meio de cultura, TSA (Difco) sobre cada placa (90 x 15mm) para a realização do teste. As suspensões dos microrganismos foram semeadas sobre a superfície dos meios em três direções, com o auxílio de um *swab* estéril. Sobre o meio solidificado, foram realizados 6 orifícios com o auxílio de um furador de metal, de 3mm de diâmetro e 5mm de altura, onde foram colocadas as amostras, correspondentes a um volume de 0,1mL (Figura 9).

Foi utilizado um orifício central embebido com o solvente para comparação dos resultados (controle) e as placas foram incubadas em estufa a $36 \pm 1^\circ\text{C}$, por 48 horas. As leituras foram efetuadas após a incubação (MURRAY, 2003).

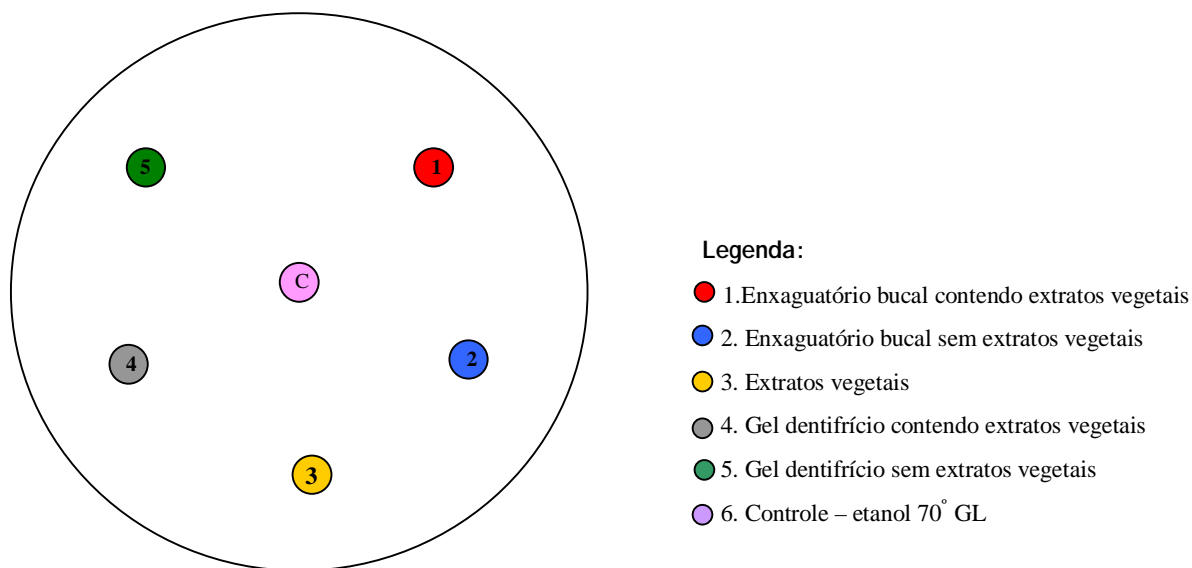


Figura 9 - Esquema da disposição dos orifícios no meio de cultura

4.2.8.3. Teste de difusão em ágar, utilizando *template*

Para os estudos utilizando o método de difusão em ágar com *template*, foram distribuídos 20mL do meio de cultura, TSA (Difco) sobre cada placa (90 x 15mm). As suspensões dos microrganismos foram semeadas sobre a superfície dos meios em três direções, com o auxílio de um *swab* estéril.

Após semeada a suspensão bacteriana, colocou-se sobre a placa o *template* e sobre cada um dos seus orifícios as amostras (50µL), também preparadas como descrito anteriormente (Figura 10).

Um disco de papel contendo 30mcg de Cloranfenicol, foi utilizado como controle. Foram utilizadas cinco placas, cada uma contendo a espécie de bactéria semeada. As placas foram incubadas em estufa a $36^{\circ}\pm 1^{\circ}\text{C}$, por 48 horas. As leituras foram efetuadas após incubação (MURRAY, 2003).

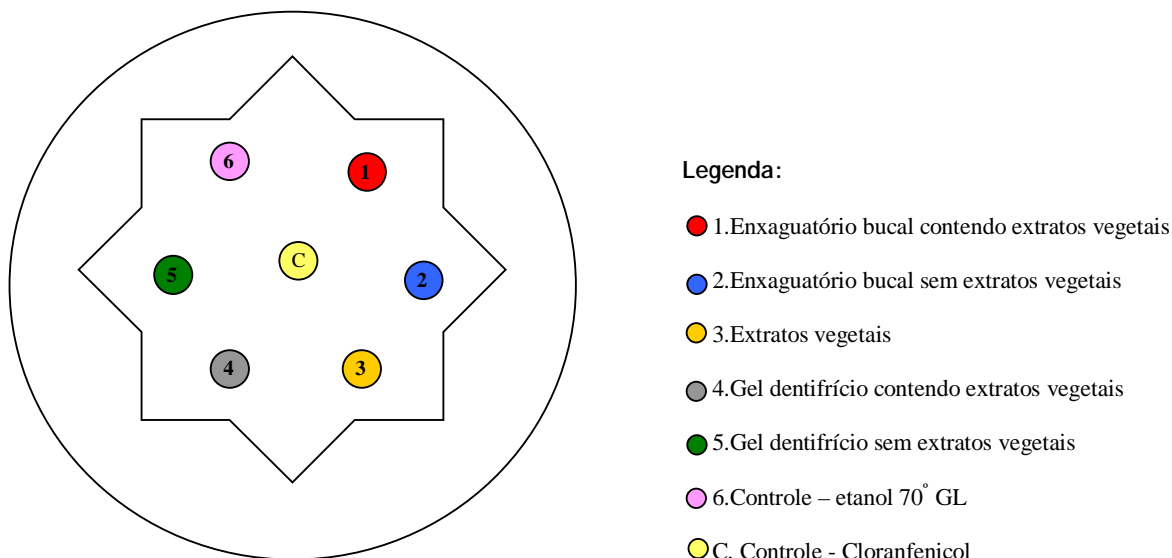


Figura 10 - Esquema de utilização do *template*

4.2.8.4. Determinação da concentração inibitória mínima

A concentração inibitória mínima (CIM) foi determinada para as amostras em estudo, pelo método de diluições sucessivas em meio de cultura líquido. Foram preparadas séries com 8 tubos de cultura contendo caldo Müller-Hinton (MHB), e nos 7 primeiros, foram preparadas concentrações decrescentes de cada amostra (mistura de extratos vegetais, gel dentifrício contendo extratos vegetais e sem extratos, enxaguatório bucal contendo extratos vegetais e sem extratos). O 8º tubo representava o controle do crescimento bacteriano.

Em cada série foi semeada 50µL de suspensão bacteriana (*S. aureus*, *B. subtilis*, *E. coli*, *P. aeruginosa* e *E. faecalis*). Foram obtidas dessa maneira, 5 séries de tubos (cada uma correspondente a uma espécie de bactéria) para cada uma das amostras em análise. As concentrações das amostras foram as seguintes:

- para a mistura de extratos: 75,5mg/mL; 37,75mg/mL; 18,87mg/mL; 9,44mg/mL; 4,72mg/mL; 2,36mg/mL; 1,18mg/mL.
- para o enxaguatório bucal contendo extratos vegetais e sem extratos: 2500,00µL/mL; 1250,00µL/mL; 625,00µL/mL; 312,50µL/mL; 156,25µL/mL; 78,12µL/mL; 39,06µL/mL.
- para o gel dentifrício contendo extratos vegetais e sem extratos vegetais: 50mg/mL; 25mg/mL; 12,5mg/mL; 6,25mg/mL; 3,125mg/mL; 1,562mg/mL; 0,781mg/mL.

As amostras foram preparadas da mesma maneira como descrito para o teste de difusão em ágar, utilizando-se disco de papel (item 4.2.8.1.).

Os tubos foram incubados em estufa a $36^{\circ}\pm 1^{\circ}\text{C}$, por 48 horas. As leituras foram efetuadas após 48 horas de incubação.

4.2.9. Determinação da atividade antiinflamatória *in vivo*

De acordo com a aprovação do Comitê de Ética da FCF/UNESP (Anexo), este estudo foi realizado no Laboratório de Farmacologia, da Faculdade de Ciências Farmacêuticas, UNESP, Campus de Araraquara. Para tal, foi utilizada a metodologia de avaliação do edema de pata, induzido por carragenina, em ratos (WINTER et al., 1962).

Os animais receberam injeção de carragenina, na planta da pata e as medições se deram através de um espessímetro.

A mistura de extratos foi submetida à secagem à temperatura inferior à 40°C e o resíduo foi disperso em DMSO e, posteriormente injetado nas cobaias, para avaliação de sua atividade.

Foram utilizados ratos machos com pesos compreendidos entre 180g a 200g, fornecidos pelo Biotério Central da Faculdade de Ciências Farmacêuticas, UNESP, Campus de Araraquara. Estes foram mantidos em gaiolas de policarbonato, com água e ração (Purina®) *ad libitum*, em local climatizado ($23 \pm 2^{\circ}\text{C}$, $56 \pm 2\%$ de umidade relativa do ar), com controle de claro e escuro a cada período de 12 horas.

Os animais em estudo foram divididos em 2 grupos de 6, todos receberam carragenina (200 μg /pata), por via intraplantar (pata posterior esquerda). O primeiro grupo de animais (grupo controle) recebeu 1mL/Kg de dimetilsulfóxido (DMSO), por via intraperitoneal, enquanto que o segundo grupo de animais recebeu, por via intraperitoneal, 200mg/Kg do resíduo da mistura de extratos vegetais ressuspenso em DMSO, 60 minutos antes da administração da carragenina.

A espessura das patas foi medida 2, 3 e 4 horas após a administração da carragenina. Os dados obtidos foram analisados pelo teste “t” para as amostras dependentes considerando-se o nível de significância de 5,0%.

4.2.10. Avaliação da atividade imunológica

De acordo com a aprovação do Comitê de Ética da FCF/UNESP (Anexo), este estudo foi realizado no Laboratório de Imunologia Clínica, da Faculdade de Ciências Farmacêuticas, UNESP, Campus de Araraquara.

Para a realização dos ensaios, os extratos das plantas *P. major* (tanchagem), *N. officinale* (agrião), *R. officinalis* (alecrim), *T. impetiginosa* (ipê roxo) e *A. millefolium* (mil-folhas), separadamente e em associação, foram reduzidos a resíduo, em estufa a 40°C. Foram preparadas soluções do resíduo com DMSO de 100mg/mL para cada espécie vegetal e para a mistura dos extratos. A partir dessas soluções, foram preparadas soluções de 4, 2, 1, 0,5, 0,25 e 0,125mg/mL utilizando como diluente RPMI-1640.

Foram utilizados camundongos Swiss machos de 6 semanas, pesando entre 18 e 25g, fornecidos pelo Biotério Central da Faculdade de Ciências Farmacêuticas, UNESP, Campus de Araraquara. Estes foram mantidos em gaiolas de policarbonato, com água e ração (Purina®) *ad libitum*, em local climatizado ($23 \pm 2^\circ\text{C}$, $56 \pm 2\%$ de umidade relativa do ar), com controle de claro e escuro a cada período de 12 horas.

Os camundongos foram previamente estimulados através da inoculação intraperitoneal de 3,0mL de solução de tioglicolato de sódio a 3% (Difco), três a quatro dias antes da coleta de células.

Após esse período, os animais foram sacrificados. E, após a exposição do peritônio, em fluxo laminar classe 100, procedeu-se à inoculação de 5,0mL de solução salina tamponada com fosfato (PBS) estéril, pH 7,2, com auxílio de seringa e agulha estéreis. Após uma massagem manual do peritônio, procedeu-se à coleta do exsudato, utilizando a mesma seringa. O líquido peritoneal resultante foi transferido para tubo cônico estéril, para preparo da suspensão celular. As células do exsudato foram lavadas com 5mL de tampão PBS, por 3 vezes e centrifugadas a $400 \times g$ durante 5 minutos em centrífuga, a temperatura ambiente. As células sedimentadas foram ressuspensas em meio de cultura RPMI-1640, suplementado com 5% de soro fetal bovino, 100µl de estreptomicina, 100µl/mL de penicilina e 2mM de L-glutamina e assim designado como meio completo (RPMI-1640-C).

O número de células foi determinado pela contagem em câmara hemocitométrica de Neubauer, com a utilização de 10µL da suspensão celular diluídos em 90µL de Líquido de Lázarus. As células foram ajustadas à concentração ideal para cada ensaio em meio RPMI-1640-C.

4.2.10.1. Avaliação da citotoxicidade dos extratos em cultura de macrófagos

O objetivo desse experimento foi observar a viabilidade dos macrófagos na presença de diferentes concentrações dos extratos vegetais. Foi utilizada a suspensão de células peritoneais, ajustadas à concentração de 5×10^6 células/mL (MOSMANN, 1983). Em placas de microtitulação de 96 cavidades, foram adicionadas suspensões de células do exsudato peritoneal (100 μ L por cavidade) e 100 μ L das várias concentrações (4,2,1,0.5,0.25,0.125mg/mL) dos extratos vegetais. As placas foram incubadas por 24 horas em estufa a 37°C, com tensão constante de 5% de CO₂.

Após esse período, o conteúdo da placa foi vertido e foram adicionados sobre a cultura celular uma solução de brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2-5-difeniltetrazólico (MTT) a 1,0mg/mL, diluído em tampão PBS. A placa foi incubada por mais 3h nas mesmas condições anteriores.

Após esse período, o conteúdo da placa foi novamente vertido e 100 μ L de álcool isopropílico foram adicionados a cada cavidade. Foram utilizados como controle, somente as células e o meio de cultura RPMI-1640, equivalente a 100% de viabilidade dos macrófagos.

A leitura foi feita em espectrofotômetro UV/visível a 540nm e filtro de referência a 620nm. As amostras foram ensaiadas em triplicata e os resultados foram expressos em % de viabilidade celular.

4.2.10.2. Determinação da liberação de peróxido de hidrogênio (H₂O₂)

A produção de peróxido de hidrogênio por macrófagos cultivados *in vitro* foi determinada segundo o método descrito por Pick & Keisari (1980) e adaptado por Pick & Mizel (1981).

Foram preparadas suspensões de células peritoneais na concentração de 2×10^6 células/mL em solução de vermelho de fenol, contendo: 140mM de NaCl; 10mM de tampão fosfato de potássio, pH 7,0; 5,5mM de dextrose; 0,56mM de vermelho de fenol e 0,01mg/mL de peroxidase de raiz forte tipo II.

Alíquotas de 100 μ l foram transferidas para cada cavidade das placas contendo 96 escavações. Foram acrescentados 50 μ L de soluções dos extratos em estudo, 50 μ L de uma solução a 5mg/mL de Zimosan A (de *Saccharomyces cerevisiae*) em tampão vermelho de

fenol (controle positivo) e 50 μ L de solução completa de vermelho de fenol (controle negativo).

As placas foram incubadas por 60 minutos em estufa à 37°C com 5% de CO₂. Após a incubação, a reação foi interrompida com a adição de 50 μ L/cavidade de NaOH 5N, e a seguir foram feitas as leituras em espectrofotômetro UV/visível de microplacas a 620nm. As amostras foram ensaiadas em triplicata. Os resultados foram expressos em nanomoles de H₂O₂/2x10⁵ células, a partir de uma curva padrão previamente estabelecida, constituída de concentrações molares conhecidas de H₂O₂ em tampão vermelho de fenol.

4.2.10.3. Deteminação da liberação de óxido nítrico (NO)

O óxido nítrico, quantificado pelo acúmulo de nitrito em meio de cultura, foi medido por espectrofotômetro utilizando o reagente de Griess com nitrito de sódio (NaNO₂) como padrão (GREEN et al., 1982).

Foram preparadas suspensões celulares ajustadas a 5 x 10⁶ células/mL em meio de RPMI-1640 a partir de macrófagos murinos, e foram distribuídos 100 μ L em placas de 96 cavidades.

Foram adicionados 100 μ L dos extratos das plantas em estudo, ou 100 μ L de uma solução de LPS a 10 μ g/mL como agente estimulante (controle positivo) ou 100 μ L de RPMI-1640 (controle negativo). A placa assim constituída foi incubada por 24 horas em estufa a 37°C com tensão constante de 5% CO₂.

Após a incubação, foram retiradas alíquotas de 50 μ L de cada amostra, passadas para uma outra placa e adicionados mais 50 μ L/cavidade de reagente de Griess, constituído de 0,1% de N-1-naftil-etilenodiamino, 0,1% de sulfanilamida e ácido fosfórico a 3%.

Após 10 minutos à temperatura ambiente, as placas foram lidas em espectrofotômetro UV/visível de microplacas, em 540nm.

As concentrações de NO liberadas foram calculadas a partir de uma curva padrão previamente estabelecida com concentrações molares conhecidas de nitrito de sódio em meio RPMI-1640.

Os testes foram realizados em triplicata e os valores expressos em μ mols de NO/5x10⁵ células peritoneais.

4.2.10.4. Determinação da liberação da citocina Tnf- α (fator de necrose tumoral- α)

A citocina TNF- α liberada nos sobrenadantes de cultura de células aderentes *in vitro* foi baseada na propriedade que tem o TNF- α de lisar certas linhagens de células tumorais (CARSWELL et al., 1975).

Os sobrenadantes das culturas de macrófagos foram utilizados na determinação de TNF- α , as células foram ajustadas para a concentração de 5×10^6 células/mL em RPMI-1640-C e distribuídas em placas de cultura de 24 cavidades. A cada cavidade foram adicionados 1,0mL de suspensão celular e as placas foram incubadas por 60 minutos a 37°C em estufa com tensão constante de 5% CO₂, para adesão celular. Após essa incubação as células não aderentes foram retiradas por lavagens com o meio de cultura RPMI-1640.

Foram acrescentados 1,5mL de RPMI-1640 por cavidade, sobre os quais se adicionaram 50 μ L dos extratos vegetais ou 50 μ L de LPS (controle positivo) ou 50 μ L de RPMI-1640 (controle negativo). As placas foram incubadas por 24 horas em estufa a 37°C em estufa com tensão constante de 5% CO₂. Os sobrenadantes foram colhidos assepticamente em câmara de fluxo laminar. O conteúdo das placas foi transferido para tubos de polipropileno com tampa (*ependorffs*), que foram, em seguida centrifugados a 7800 x g durante 10 minutos em centrífuga refrigerada a 4°C. Após a centrifugação, os *ependorffs* foram amostrados e estocados em freezer a -80°C até o momento da determinação da citocina.

A liberação da citocina TNF- α foi quantificada nos sobrenadantes das culturas de macrófagos peritoneais, através do teste imunoenzimático ELISA de captura. O kit Mouse ELISA Set (Mono/Poli) da BD Biosciences Pharmingen foi utilizado de acordo com as instruções do fabricante. As placas de 96 orifícios foram adsorvidas com anticorpo de captura monoclonal anti-TNF- α . As placas foram incubadas *overnight* a 4°C. Após a incubação, as placas foram lavadas 3 vezes com solução salina tamponada com fosfato, pH 7,0, contendo 0,05% de Tween-20 (PBS-T) e posteriormente bloqueadas com 300 μ L/cavidade com solução salina tamponada com fosfatos, pH 7,0, contendo 10% de soro fetal bovino (PBS-S) à temperatura ambiente por 60 minutos.

As placas foram lavadas 3 vezes com PBS-T. Após a última lavagem foram adicionados a cada cavidade 100 μ L do padrão de citocinas ou dos sobrenadantes das culturas de células a serem testados. As placas foram incubadas à temperatura ambiente por 120 minutos e lavadas 5 vezes com PBS-T. Em seguida, foram adicionados 100 μ L/cavidade do

anticorpo de detecção (anticorpo anticitocina de camundongo marcado com biotina) diluído em PBS-S. As placas foram incubadas à temperatura ambiente por 60 minutos e lavadas 5 vezes com PBS-T, sendo então adicionados 100µL/cavidade do conjugado avidina-peroxidase diluído 1/250 em PBS-S. as placas foram incubadas novamente à temperatura ambiente por 30 minutos. Após este período de incubação, as placas foram lavadas 7 vezes com PBS-T e em seguida foi adicionado a cada cavidade 100µL do substrato [10mM de tampão citrato-fosfato, contendo 0,4mM de tetrametilbenzidina (SIGMA) e 1,2mM de H₂O₂ (Malinckrodt)]. A reação foi interrompida adicionando-se 50µL de H₂SO₄ 2N a cada cavidade. A absorvância foi lida a 450nm em espectrofotômetro UV/visível para microplacas e as concentrações da citocina foram quantificadas utilizando-se curva padrão previamente estabelecida com quantidades conhecidas dos padrões. Os resultados foram expressos em pg/mL.

A análise estatística foi realizada por intermédio do programa estatístico Graph Pad Instat, aplicando-se análise de variância com determinação do nível de significância para $p < 0,05$, através de comparações múltiplas pelo teste de Tukey.

4.2.11. Estudos clínicos

Os estudos clínicos estão em andamento na Clínica de Periodontia da Faculdade de Odontologia da UNESP, Campus de Araraquara, e como ainda não foi possível sua conclusão, estão apresentados neste trabalho, somente os dados obtidos com as avaliações realizadas para o gel dentífrico, no universo de 9 pacientes (30% do total planejado).

Após a aprovação do Projeto de Pesquisa pelo Comitê de Ética da FCF/UNESP (Anexo), foram entrevistados aproximadamente trezentos (300) indivíduos, dentre os quais foram selecionados trinta e dois (32), que apresentaram os requisitos exigidos para os estudos clínicos, quais sejam: história médica negativa para febre reumática ou problemas cardíacos que necessitassem de antibioticoterapia profilática; disfunções hepáticas, renais ou discrasias sanguíneas; de estado gestacional e/ou uso de contraceptivos nos 3 meses antecedentes ao estudo ou durante o mesmo, de antibioticoterapia e/ou de terapia periodontal nos últimos 6 meses, e/ou o uso de anti-séptico ou irrigador bucal como parte dos hábitos de higiene bucal.

Os exames clínicos foram realizados por um examinador previamente treinado e calibrado, e os Índices utilizados foram:

- Índice de Placa - IPL.;
- Índice Gengival - IG.;
- Recessão Gengival - RG - distância da margem gengival livre até a junção cimento-esmalte (J.C.E.), medida com a sonda milimetrada;
- Profundidade de Sondagem - PS - distância da porção mais apical sondável e a margem gengival livre, medida com a sonda milimetrada;
- Sangramento à Sondagem -SS- Presença (+) ou ausência (-) de sangramento após a sondagem com a sonda milimetrada da bolsa periodontal, aguardando-se 20 s.

Durante os 30 primeiros dias, o grupo de pacientes utilizou o produto, podendo o mesmo conter ou não extratos vegetais. Após este período, os voluntários fizeram um intervalo de 15 dias, durante os quais foram orientados a realizar a higiene bucal da maneira habitual, utilizando os produtos de costume. Passados os 15 dias, os voluntários utilizaram novamente o produto em estudo, porém o mesmo foi trocado (o produto contendo extratos vegetais pelo sem extratos, ou vice-versa) e os pacientes os utilizaram por mais 30 dias.

Os exames clínicos foram realizados no início e término de cada período da pesquisa, ou seja, o primeiro exame, no primeiro dia; o segundo exame, após 30 dias; o terceiro exame, após 45 dias e o quarto exame, após 75 dias.

Os indivíduos participantes do estudo foram instruídos a realizar higiene bucal diária, no mínimo três vezes ao dia, exclusivamente com o dentífrício fornecido. Os produtos contendo extratos e sem extratos, foram embalados em tubos iguais, apresentando as mesmas características quanto a cor, sabor e aroma. Os mesmos foram identificados por um código, de tal maneira que nem o voluntários ou o examinador (odontólogo) saberia a que grupo pertenceria (duplo cego).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1. Caracterização farmacognóstica preliminar

Foram realizadas as avaliações farmacognósticas preliminares com os pós (droga vegetal seca e pulverizada) e com os extratos vegetais, obtidos pelos processos descritos anteriormente. Os resultados encontrados estão descritos na Tabela 6.

Tabela 6 - Estudos farmacognósticos preliminares empregados para as drogas vegetais pulverizadas e para os extratos

| Testes de Identificação Espécie vegetal | Saponinas | | Taninos | | Antraquinonas* | | Alcalóides | | Flavonóides | |
|--|-----------|---------|---------|---------|----------------|---------|------------|---------|-------------|---------|
| | Pó | Extrato | Pó | Extrato | Pó | Extrato | Pó | Extrato | Pó | Extrato |
| <i>N. officinale</i> (agrião) | - | - | - | - | - | - | - | - | + | + |
| <i>R. officinalis</i> (alecrim) | - | - | + | + | - | - | - | - | + | + |
| <i>T. impetiginosa</i> (ipê roxo) | + | - | - | - | - | - | - | - | + | + |
| <i>A. millefolium</i> (mil-folhas) | + | - | + | + | - | - | - | - | + | + |
| <i>P. major</i> (tanchagem) | - | - | - | - | - | - | + | + | + | + |
| Mistura de extratos | NA | - | NA | + | NA | - | NA | - | NA | + |

* Livres e glicosiladas; (+) positivo; (-) negativo; (NA) não se aplica

O teor de princípios ativos de uma planta utilizada na preparação de extratos, cosméticos e/ou medicamentos varia de acordo com o órgão vegetal considerado, idade da planta, com a época da colheita e mesmo com o período do dia no qual a colheita é efetuada (OLIVEIRA et al., 1998).

As espécies vegetais desenvolveram ao longo de sua evolução, mecanismos de defesa interagindo com o meio-ambiente. As substâncias químicas produzidas são empregadas em consequência da ativação de rotas específicas do metabolismo secundário e constituem a maioria dos princípios ativos, por exemplo óleos essenciais, alcalóides, taninos e flavonóides (KRIVENKO et al., 1989).

Entre os grupos químicos pesquisados neste trabalho, cujos resultados estão apresentados na Tabela 06, a espécie *N. officinale* (agrião) apresentou-se positiva apenas para flavonóides, o que confere com a descrição de Almeida (1993), Goda et al. (1999) e Lorenzi & Matos (2002).

A espécie *R. officinalis* (alecrim) apresentou-se positiva para taninos e flavonóides, confirmando sua caracterização fitoquímica, que registra para folhas a presença de taninos, flavonóides e alguns ácidos fenólicos (MATOS, 2000; LORENZI & MATOS, 2002).

Na determinação dos grupos químicos encontrados para *T. impetiginosa* (ipê roxo), obteve-se resultado positivo para flavonóides. A literatura apresenta dados sobre a presença dessa classe de ativos nas cascas da planta o que pode ser confirmado por Teske & Trentini (1995) e Lorenzi & Matos (2002). É ainda descrita a presença de flavonóides para as flores de *T. impetiginosa* (www.rain-tree.com, 2004).

Já a *A. millefolium* (mil-folhas) apresentou resultados positivos para taninos e flavonóides, como descrito por Lorenzi & Matos (2002).

A presença de alcalóides e flavonóides para a espécie *P. major* (tanchagem) confirma o descrito por Samuelsen (2000), que se refere aos principais compostos químicos, como polissacarídeos, lipídios, derivados do ácido cafeico, flavonóides, glicosídeos iridóides e terpenóides, alcolóides e ácidos orgânicos.

5.2. Determinação do teor de flavonóides totais em relação à quercetina

Os resultados obtidos para a concentração de flavonóides totais em relação à quercetina (Tabela 7) confirmam a presença dessa classe de substâncias, de acordo com os testes de identificação para flavonóides.

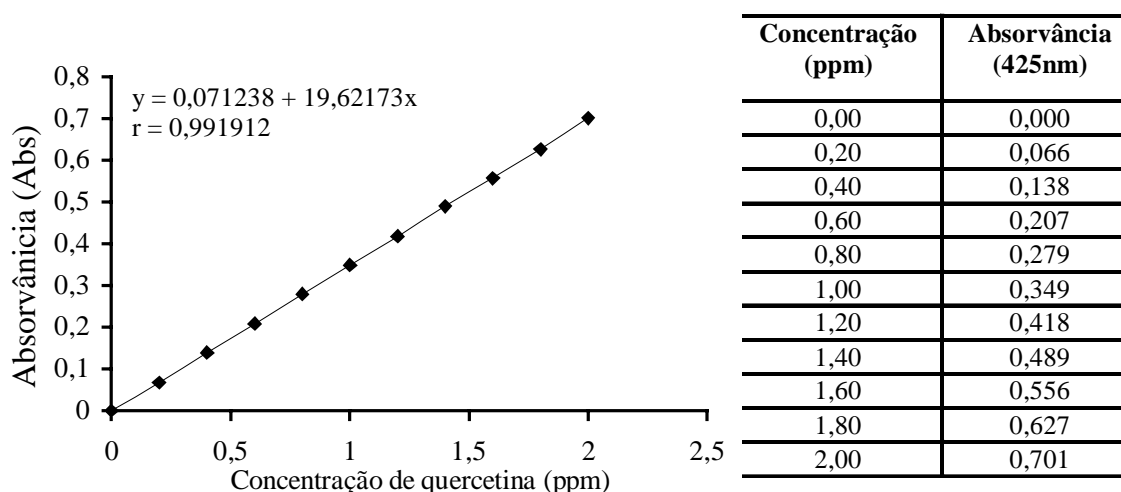


Figura 11 - Representação gráfica e valores obtidos para a curva padrão para quercetina

Tabela 7 - Concentração de flavonóides totais presentes nas drogas vegetais pulverizadas e nos extratos hidroalcoólicos

| Espécie vegetal | Concentração de flavonóides (g/100g de planta seca) | |
|------------------------------------|---|---------|
| | Pó | Extrato |
| <i>N. officinale</i> (agrião) | 0,26 | 0,02 |
| <i>R. officinalis</i> (alecrim) | 0,11 | 0,03 |
| <i>T. impetiginosa</i> (ipê roxo) | 0,18 | 0,02 |
| <i>A. millefolium</i> (mil-folhas) | 0,20 | 0,05 |
| <i>P. major</i> (tanchagem) | 0,09 | 0,02 |
| Mistura de extratos | NA | 0,02 |

NA = não se aplica

Os flavonóides formam uma classe muito ampla de substâncias naturais distribuída no reino vegetal. São compostos fenólicos presentes em todas as partes das plantas, desde as raízes até as flores e frutos, sendo encontrados nos vacúolos das células. De acordo com sua estrutura, apresentam ações farmacológicas diversas, tais como a diminuição da permeabilidade e da fragilidade dos vasos sanguíneos, ação antiinflamatória, antiespasmódica, antiviral, entre outras (SOARES et al., 2004).

A maneira mais precisa e exata de se identificar e quantificar flavonóides em produtos naturais é a análise por cromatografia líquida de alta eficiência. Entretanto, quando se pensa em controle de qualidade, é conveniente a introdução de alternativas mais simples e baratas, pois nesses casos requerem-se procedimentos que permitem a análise rápida de numerosas amostras, em laboratórios geralmente modestos no que se refere ao instrumental instalado. Uma das técnicas que se enquadram bem nesse contexto é a determinação de flavonóides totais por espectrofotometria no UV (MARCUCCI, 1995).

O uso do cloreto de alumínio ($AlCl_3$) no diagnóstico da presença de alguns grupamentos químicos foi, pela primeira vez, empregado para antocianinas. Trata-se de uma classe de pigmentos do grupo dos flavonóides, encontrados principalmente em flores, mas muitas vezes também em frutos, e que dão ao órgão vegetal colorações que podem variar do vermelho ao azul (MABRY et al., 1970). Em 1984, Harborne sugeriu o uso do cloreto de alumínio para a determinação espectrofotométrica da presença de certos grupamentos químicos em flavonóides.

VENNAT et al. (1992) desenvolveram um método para determinar o teor de flavonóides em uma planta, adaptando o método descrito por Dowd (1959) para a quercetina, o qual se baseia no uso de cloreto de alumínio. O cátion alumínio forma complexos estáveis

com os flavonóides em metanol, ocorrendo na análise espectrofotométrica um desvio para maiores comprimentos de onda e uma intensificação da absorção. Dessa maneira, é possível determinar a quantidade de flavonóides, evitando-se a interferência de outras substâncias fenólicas, principalmente os ácidos fenólicos, que invariavelmente acompanham os flavonóides nos tecidos vegetais. A leitura foi feita em espectrofotômetro a 425 nm, utilizando-se cloreto de alumínio a 2% em metanol (WOISKY & SALATINO, 1998).

O uso do cloreto de alumínio para a determinação da quantidade de flavonóides totais não é, no entanto, um procedimento isento de limitações. O método é preciso, isto é, ele é reproduzível, fornecendo desvios muito pequenos ou nulos entre um ensaio e outro com a mesma amostra. No entanto, ele pode ser pouco exato, ou seja, o valor que ele fornece pode ser diferente (geralmente inferior) em relação à quantidade de flavonóides totais realmente presente na amostra analisada. O valor medido e o valor real são tanto mais próximos entre si quanto maior a proporção de flavonóis na amostra, e tanto mais distantes quanto maior a proporção de flavonas. Isso se deve ao fato de que o comprimento de onda selecionado (425nm) corresponde à banda de absorção do complexo quercetina-Al. A quercetina é um flavonol, certamente o mais comum dos flavonóides encontrado nas plantas. Os complexos dos outros flavonóis com alumínio absorvem bem próximo de 425nm, mas os complexos derivados de flavonas absorvem em comprimentos de onda inferiores, o que causa uma subestimativa nas determinações de misturas muito ricas em flavonas (MARCUCCI, 1995).

No entanto, essa limitação não reduz a validade do método para os propósitos do controle de qualidade. Nesse contexto, é mais importante precisão do que exatidão, pois no controle de qualidade o que normalmente se faz é estabelecer limites inferiores e superiores, dentro dos quais os valores encontrados devem se situar nas condições prescritas pelo método. Desvios muito grandes em relação aos limites estabelecidos podem significar adulterações, manipulações inadequadas, armazenamento por períodos inaceitavelmente longos, esgotamento dos princípios ativos da amostra e etc. A determinação do conteúdo real de flavonóides nas amostras analisadas é menos importante, embora a exatidão seja uma característica desejável nos procedimentos para o controle de qualidade (MARCUCCI, 1995).

5.3. Determinação da umidade em balança de infravermelho

Em relação à determinação da umidade os resultados encontrados correspondem à média dos valores obtidos em triplicata, e são os que se apresentam na Tabela 8.

Tabela 8 - Determinação da umidade

| Espécie vegetal (pulverizada) | Resultados % (p/p) |
|--------------------------------------|---------------------------|
| <i>N. officinale</i> (agrião) | 11,5 |
| <i>R. officinalis</i> (alecrim) | 10,3 |
| <i>T. impetiginos</i> (ipê roxo) | 6,6 |
| <i>A. millefolium</i> (mil-folhas) | 5,0 |
| <i>P. major</i> (tanchagem) | 11,1 |

Segundo a Farmacopéia Brasileira IV edição, a presença de quantidade excessiva de água em drogas vegetais propicia o desenvolvimento de microrganismos, insetos e hidrólise de constituintes da droga. Daí a necessidade do estabelecimento de limites de umidade para drogas vegetais, em geral, na faixa de 8 a 14%. Portanto, as drogas vegetais avaliadas, encontram-se em conformidade com os requisitos exigidos para o método.

5.4. Preparo das formas farmacêuticas: enxagüatório bucal e gel dentifrício

5.4.1. Enxagüatório bucal

Considerando que os extratos vegetais hidroalcoólicos apresentaram formação de precipitados em presença de água destilada, principal solvente da formulação, foi necessário garantir sua solubilidade, dispondo de um agente solubilizante que não se mostrasse tóxico, nem irritante. O agente escolhido foi o monoleato de polioxietileno sorbitano que, além das características mencionadas não interferiu no paladar final do enxagüatório, o que constitui um fator importante para a obtenção de um produto de sabor aceitável e agradável. Para isso foram realizados testes de solubilidade utilizando várias concentrações do tensoativo, que permitiu viabilizar a concentração de extratos vegetais adequada para as possíveis ações terapêuticas (TREVIZANI, 2002). A concentração final de monoleato de polioxietileno sorbitano ficou definida em 0,5%. Para realização destes testes foi utilizada a mistura dos extratos hidroalcoólicos, na proporção na metodologia (12%), pois corresponde a mesma que seria utilizada para preparação do enxagüatório bucal.

Em ensaios preliminares utilizando-se vários edulcorantes, optou-se pela sacarina sódica, ficando definida a quantidade de sacarina a ser utilizada na formulação de 0,025%.

Para a obtenção do enxagüatório bucal não contendo extratos vegetais o restante dos componentes da formulação foi mantido, e foi adicionada uma mistura de corantes previamente preparada para que a cor do produto contendo extratos, fornecida pela mistura dos mesmos, pudesse ser reproduzida no produto sem os extratos vegetais. A solução final de corantes obtida (contendo 4,0 mL de corante verde a 1%; 5,0 mL de corante amarelo a 1% e 3,0 mL de corante vermelho a 1%) foi utilizada na elaboração do produto na concentração de 0,24%. Esta concentração foi determinada comparado-se visualmente a cor dos dois produtos em estudo, à medida que a solução de corantes era acrescentada sobre o enxagüatório bucal sem extratos. Em ambas as formulações (contendo extratos e sem extratos) foram acrescentados 0,1% de solução de corante verde (a 1,0%), também com o objetivo de melhorar o aspecto do produto e sua aceitação.

Portanto a formulação do enxagüatório bucal contendo extratos vegetais e sem extratos, ficou definida como mostrado abaixo (Tabela 9):

Tabela 9 - Formulações de enxagüatório bucal

| Formulação | INCI name | Enxagüatório bucal(%p/p) | |
|-------------------------------------|----------------------------|----------------------------|--------------------------------|
| | | Contendo extratos vegetais | Não contendo extratos vegetais |
| Etanol 70°GL | <i>Alcohol 70°GL</i> | NA | 12 |
| Extratos vegetais | - | 12 | NA |
| Aroma de <i>peppermint</i> | <i>Mentha Piperita oil</i> | 0,06 | 0,06 |
| Sacarina sódica | <i>Sodium Saccharin</i> | 0,025 | 0,025 |
| Monoleato de polioetileno sorbitano | <i>Polysorbate 80</i> | 0,50 | 0,50 |
| Metilparabeno | <i>Methylparaben</i> | 0,1 | 0,1 |
| Solução de corantes | - | NA | 0,24 |
| Solução corante verde | - | 0,1 | 0,1 |
| Água destilada q.s.p. | <i>Water</i> | 100 | 100 |

NA: não se aplica

A formulação de enxagüatório bucal contendo extratos vegetais, apresentou cor verde amarelada, mostrando-se límpida, sem a ocorrência de turvação mesmo após ser armazenada sob refrigeração a 4°C por três dias e à temperatura ambiente (em torno de 27°C) também por três dias. Apresentou, ainda, odor e sabor de menta, adocicado, e um pH de 6,5 a temperatura de 25°C.

A formulação de enxagüatório bucal não contendo extratos vegetais, também apresentou características organolépticas semelhantes às da formulação anterior, de cor verde amarelada, límpida, sem a ocorrência de turvação mesmo após ser armazenada sob

refrigeração a 4°C por três dias e à temperatura ambiente (em torno de 27°C) também por três dias, apresentando também, odor e sabor de menta, adocicado, e um pH de 6,2 a temperatura de 25° C.

A maneira escolhida para se resolver o problema da precipitação de substâncias presentes nos extratos vegetais utilizados, foi incluir à preparação um tensoativo solubilizante. Esta escolha se baseou não somente no critério capacidade de solubilização, mas considerou-se ainda a influência sobre o sensorial gustativo (sabor final do produto), e sua toxicidade para a utilização nesse tipo de formulação. Por isso, foi escolhido o agente monoleato de polioxietileno sorbitano (*Polysorbate 80*), que se apresentou mais adequado para os fins pretendidos (PRISTA et al., 1995).

5.4.2. Gel dentifrício

As formulações do gel dentifrício ficaram definidas como mostrado abaixo:

Tabela 10 - Formulações de gel dentifrício

| Formulação | INCI name | Gel dentifrício (%p/p) | |
|----------------------------|------------------------------|----------------------------|--------------------------------|
| | | Contendo extratos vegetais | Não contendo extratos vegetais |
| Extratos vegetais | - | 12,00 | NA |
| Etanol 70°GL | <i>Alcohol 70°GL</i> | NA | 12 |
| Aroma de <i>pippermint</i> | <i>Mentha Piperita</i> | 0,20 | 0,20 |
| Sacarina sódica | <i>Sodium Saccharin</i> | 0,075 | 0,075 |
| Carboximetilcelulose | <i>Cellulose Gum</i> | 0,40 | 0,40 |
| Sílica abrasiva | <i>Silica</i> | 14,0 | 14,0 |
| Lauril Sulfato de Sódio | <i>Sodium Lauryl Sulfate</i> | 1,0 | 1,0 |
| Metilparabeno | <i>Methylparaben</i> | 0,10 | 0,10 |
| Sorbitol | <i>Sorbitol</i> | 71,025 | 71,025 |
| Solução de corantes | - | NA | 0,12 |
| Água destilada | <i>Water</i> | 1,2 | 1,08 |

NA: não se aplica

A formulação de gel dentifrício contendo extratos apresentou-se límpida, de cor verde amarelada, de odor e sabor de menta, adocicado. O valor de pH encontrado foi de 6,89 a temperatura de 25°C.

A formulação de gel dentifrício não contendo extratos apresentou características organolépticas semelhantes às da formulação anterior, mostrando-se límpida, de cor verde amarelada, de odor e sabor de menta, adocicado. O pH encontrado foi de 6,68 a temperatura de 25°C.

O valor de pH para os géis indica uma condição “ligeiramente ácida” característica dos produtos que contém sílica como agentes abrasivos. Mas encontram-se dentro da faixa de 4,5 e 10,5, determinada pelas normas da ABO nº 1 1999 (PANZERI et al., 1999).

Os testes de controle de qualidade físico-químicos, recomendados por Pader (1988) e pelas normas da ABO nº 1 (1999), para a formulação base do gel dentifrício, foram realizados por Trevizani (2002). Os estudos laboratoriais revelaram condições ideais para o emprego do produto como agente terapêutico: baixa abrasividade e valores de índice de espuma, consistência, densidade e reologia adequados.

5.5. Contagem microbiana, pesquisa e identificação de patógeno

A contagem total de microrganismos tem por objetivo determinar a densidade da população microbiana em geral (CARTURAN, 1999). Este método é capaz de determinar o número de bactérias e fungos presentes em produtos e matérias-primas não estéreis (F. Bras. IV, 1988). O método consiste na contagem da população de microrganismos que apresentem crescimento visível, em 4 dias (bactérias) em Ágar Caseína-Soja (a 35°C) e em 7 dias (fungos e leveduras) em Ágar Sabouraud-Dextrose (a 25°C). Essa determinação foi efetuada através do método de contagem em placa, segundo a Farmacopéia Brasileira IV edição (1988).

O método aplica-se a todo material susceptível à contaminação microbiológica (produto acabado, semi-acabado, matérias-primas, águas, etc.) quando da determinação quantitativa, utilizando a técnica de semeadura em profundidade (CARTURAN, 1999).

Os parâmetros descritos pela Cosmetic Toiletry and Fragrance Association (CTFA), cujos limites se tornaram padrão de referência internacional, foram adotados como critério. Tais limites consideram tolerância de não mais que 500 UFC/g para produtos para bebês e para aqueles utilizados na área dos olhos e, não mais que 10³ UFC/g para todos os outros, além de mencionar que nenhum produto deve ter conteúdo microbiano nocivo para o usuário. Os parâmetros mencionados pela Resolução RDC nº 17, de 24 de fevereiro de 2000, para produtos fitoterápicos, menciona que a pesquisa de contaminantes microbiológicos deve estar de acordo com critérios farmacopéicos (PINTO et al., 2003). Para matérias-primas de origem vegetal, a

tolerância é de no máximo 500UFC/g ou mL para microrganismos totais aeróbios. Os resultados encontrados foram os seguintes: gel dentifrício contendo extratos vegetais: 636UFC/g; gel dentifrício sem extratos vegetais: 24UFC/g; enxagüatório bucal contendo extratos vegetais: 584UFC/mL; enxagüatório bucal sem extratos vegetais: 27UFC/mL; mistura de extratos vegetais: 184UFC/g. Todas as amostras apresentaram crescimento microbiano negativo para as espécies patogênicas consideradas (*P. aeruginosa*, *S. aureus*, *E. coli* e *Salmonella sp*). Portanto, considerando as especificações citadas, as amostras analisadas encontram-se aprovadas, não apresentando microrganismos nocivos ao usuário e contendo um número de microrganismos totais compatíveis com as categorias dos produtos em estudo.

5.6. Avaliação da atividade antibacteriana in vitro

De acordo com os estudos de atividade antibacteriana foi possível verificar que o crescimento das espécies de microrganismos foi inibido pela mistura de extratos, observando-se que as espécies *S. aureus* e *B. subtilis* apresentaram, aparentemente, maior sensibilidade.

O diâmetro dos halos de inibição observados pelos estudos são dados em milímetros, após 48 horas de incubação, e são apresentados nas tabelas a seguir (Tabelas 11, 12 e 13; Figuras 12, 13 e 14).

Tabela 11 - Halos de inibição obtidos pelo teste de difusão em ágar, utilizando disco de papel

| Amostra Microorganismo | Halos de inibição (mm) | | | | | |
|-------------------------------|------------------------|---------------------|----------------------------|--------------------------------|----------------------------|--------------------------------|
| | Controle etanol 70° GL | Mistura de extratos | Enxagüatório bucal | | Gel dentifrício | |
| | | | Contendo extratos vegetais | Não contendo extratos vegetais | Contendo extratos vegetais | Não contendo extratos vegetais |
| <i>S. aureus</i> | R | 19 | R | R | R | R |
| <i>B. subtilis</i> | R | 19 | R | R | 21 | 19 |
| <i>P. aeruginosa</i> | R | R | R | R | R | R |
| <i>E. coli</i> | R | R | R | R | R | R |
| <i>E. faecalis</i> | R | 17 | R | R | R | R |

R: resistente (halo < 1mm)

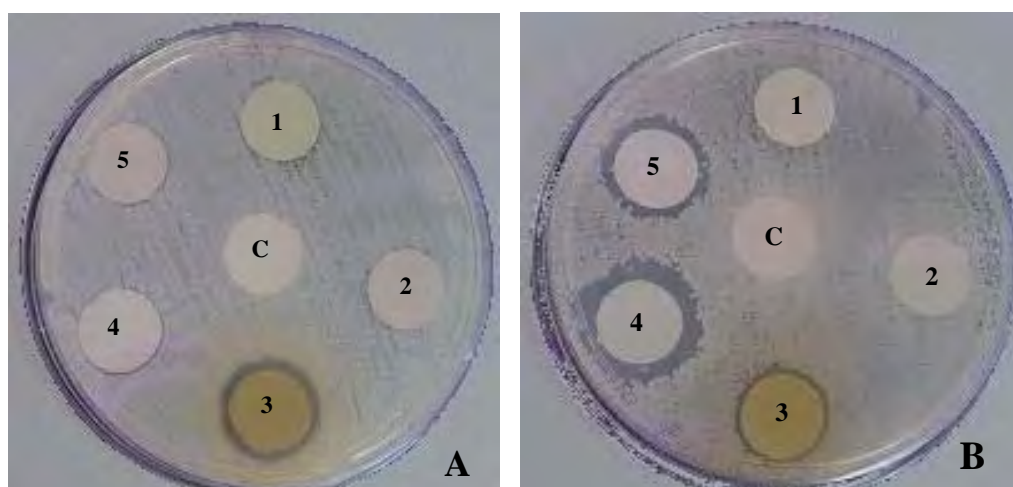


Figura 12 - Avaliação da atividade antibacteriana das amostras de enxagüatório bucal contendo extratos vegetais (1) e sem extratos (2), da mistura de extratos vegetais (3), do gel dentifrício contendo extratos vegetais (4) e sem extratos (5) frente a *S. aureus* (A) e *B. subtilis* (B).

Tabela 12 - Halos de inibição obtidos pelo teste de difusão por *hole plate*

| Amostra | Halos de inibição (mm) | | | | | |
|----------------------|------------------------|---------------------|----------------------------|--------------------------------|----------------------------|--------------------------------|
| | Controle etanol 70° GL | Mistura de extratos | Enxaguatório bucal | | Gel dentifrício | |
| | | | Contendo extratos vegetais | Não contendo extratos vegetais | Contendo extratos vegetais | Não contendo extratos vegetais |
| <i>S. aureus</i> | R | 7 | R | R | 9 | 7 |
| <i>B. subtilis</i> | R | 9 | 5 | 5 | 9 | 7 |
| <i>P. aeruginosa</i> | R | 13 | 5 | 5 | 9 | 9 |
| <i>E. coli</i> | R | 5 | R | 5 | R | R |
| <i>E. faecalis</i> | R | 7 | R | R | 9 | 9 |

R: resistente (halo < 1mm)

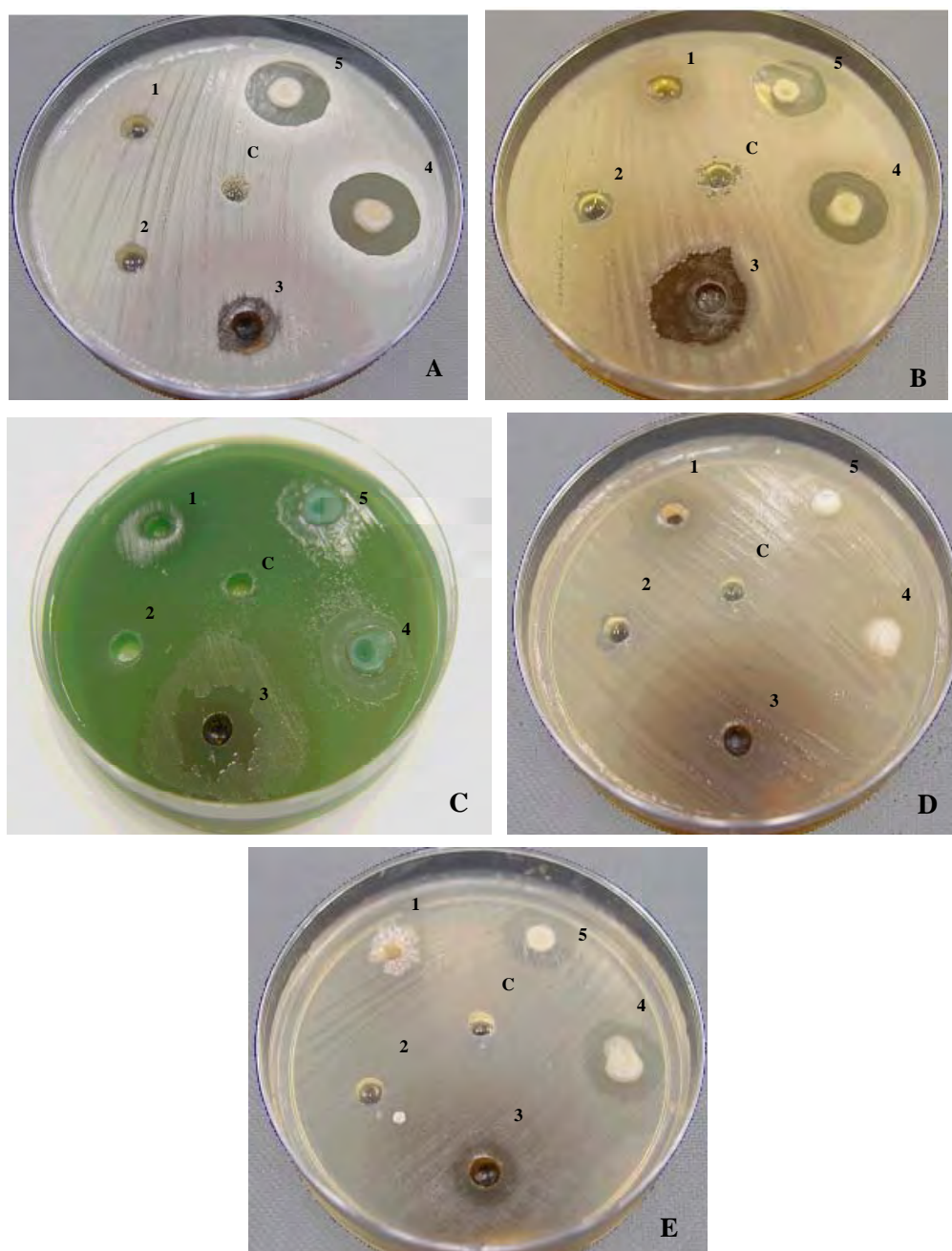


Figura 13 - Avaliação da atividade antibacteriana pelo método de difusão em ágar, utilizando *hole plate*, para o enxaguatório bucal contendo extratos vegetais (1) e sem extratos (2), mistura de extratos vegetais (3), gel dentifrício contendo extratos vegetais (4) e sem extratos (5), etanol 70° GL (C), frente à *S. aureus* (A); *B.subtilis* (B); *P. aeruginosa*. (C); *E. coli* (D) e *E.faecalis* (E).

Tabela 13 - Halos de inibição obtidos pelo teste de difusão em ágar, utilizando *template*

| Amostra Microorganismo | Halos de inibição (mm) | | | | | |
|-------------------------------|------------------------|---------------------|----------------------------|--------------------------------|----------------------------|--------------------------------|
| | Cloranfenicol | Mistura de extratos | Enxagüatório bucal | | Gel dentifrício | |
| | | | Contendo extratos vegetais | Não contendo extratos vegetais | Contendo extratos vegetais | Não contendo extratos vegetais |
| <i>S. aureus</i> | 17 | 5 | 5 | 5 | 7 | 7 |
| <i>B. subtilis</i> | 19 | 7 | 5 | 5 | 5 | 5 |
| <i>P. aeruginosa</i> | R | 7 | 5 | 5 | 5 | 5 |
| <i>E. coli</i> | 17 | 7 | R | R | 5 | 5 |
| <i>E. faecalis</i> | 15 | 5 | R | 5 | 5 | 5 |

R: resistente (halo < 1mm)

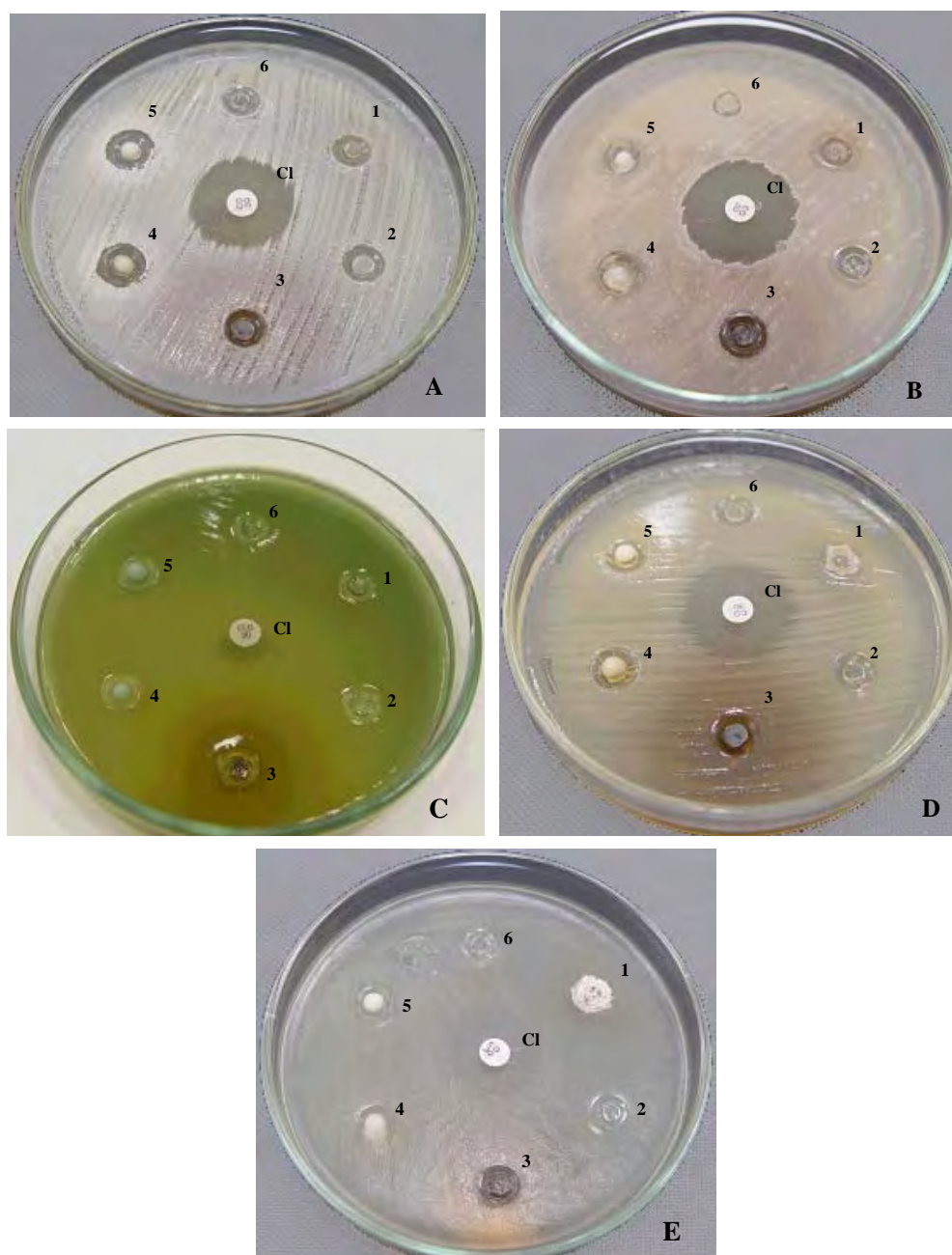


Figura 14 - Avaliação da atividade antibacteriana pelo método de difusão utilizando *template* para o enxagüatório bucal contendo extratos vegetais (1) e sem extratos (2), mistura de extratos vegetais (3), gel dentifrício contendo extratos vegetais (4) e sem extratos (5), controle – etanol 70° GL (6), frente à *S. aureus* (A); *B.subtilis* (B); *P. aeruginosa* (C); *E. coli* (D), *E.faecalis* (E).

No teste de difusão em ágar, utilizando disco de papel, os halos de inibição revelaram para *S. aureus*, *B. subtilis* e *E. faecalis*, empecilho ao seu crescimento frente a mistura de extratos. Neste teste, *P. aeruginosa* e *E. coli*, apresentaram-se resistentes.

No teste de difusão em ágar, utilizando *hole plate* observou-se a formação de halos de inibição para todos os microrganismos. A espécie *P. aeruginosa* que apresentou resistência, no teste de difusão utilizando disco de papel, apresentou, nesta etapa, maior valor para o halo de inibição frente à mistura de extratos.

No teste de difusão utilizando *template*, os resultados confirmaram os obtidos anteriormente que, em comparação com o Cloranfenicol, as espécies *S. aureus* e *B. subtilis* foram as cepas mais sensíveis. O enxagüatório também apresentou certa atividade, porém não foi observada diferença entre os resultados apresentados pela formulação contendo extratos vegetais e sem extratos. A espécie *P. aeruginosa* foi inibida de maneira muito semelhante por todas as amostras. As espécies *E. coli* e *E. faecalis*, sofreram certa inibição das amostras, porém de maneira semelhante entre elas, sendo que somente o Cloranfenicol inibiu de maneira significativa todas as espécies em estudo, com exceção da espécie *P. aeruginosa*.

Observa-se conforme a literatura, que as bactérias Gram-negativas (*P. aeruginosa*, *E. coli*) mostram-se mais resistentes que as bactérias Gram-positivas (*S. aureus*, *B. subtilis*) que se apresentam mais sensíveis, sendo que a espécie *B. subtilis* foi a mais sensível delas. A menor atividade observada em bactérias Gram-negativas se dá pelo fato das mesmas apresentarem uma membrana mais externa, que dificulta a entrada de numerosas moléculas de antibióticos e pela presença de enzimas no espaço periplasmático, responsáveis pela degradação de moléculas introduzidas no meio (PESSINI et al., 2003).

Os resultados obtidos neste estudo mostraram que o enxagüatório bucal e o gel dentifrício contendo extratos vegetais foram capazes de inibir o crescimento de todas as bactérias estudadas, porém as espécies que se mostraram mais sensíveis, aparentemente, foram *S. aureus* e *B. subtilis*, em meio de cultura TSA, após 48 horas. Embora não exista um padrão de concentração para comparação dos resultados da atividade dos extratos e dos produtos, uma vez que seus princípios ativos ainda não são bem conhecidos, algumas bactérias estudadas (principalmente *B. subtilis* e *S. aureus*) apresentaram halos de inibição consideráveis.

O fato das formulações de gel dentifrício (contendo ou não extratos vegetais) apresentarem halos de inibição semelhantes entre si, está relacionado à atividade de outro componente da formulação. Trevizani (2002) sugeriu que esse fato poderia ser devido à presença de fluoreto de sódio. Contudo, como tal componente não fez parte das formulações aqui estudadas, sugere-se que essa propriedade seja atribuída ao lauril sulfato de sódio. Outros

estudos têm relatado a ação antimicrobiana deste composto, principalmente sobre bactérias Gram-positivas (WAALER et al., 1993; ROWE et al., 2003).

Em relação à determinação da CIM, para os tubos nos quais não foi verificada a ocorrência de turvação, foram realizados repiques para meios sólidos, objetivando-se verificar a ação bacteriostática. A resistência ou sensibilidade da bactéria em estudo foi registrada e os dados são os que se seguem.

Observando-se os resultados obtidos, verificou-se que seu valor variou de 9,44mg/mL a 37,75mg/mL para a mistura de extratos vegetais, e de 625µL/mL a 2500µL/mL para o enxagüatório contendo extratos vegetais e 625µL/mL a 2500µL/mL para enxagüatório sem extratos, para o gel dentifrício contendo extratos vegetais e sem extratos foi de 25mg/mL (Tabela 14).

Tabela 14 - Valores de CIM para as amostras analisadas

| Amostra Microorganismo | Concentração | | | | |
|---------------------------|-----------------------------|----------------------------|--------------------------------|----------------------------|--------------------------------|
| | Mistura de extratos (mg/mL) | Enxagüatório bucal (µL/mL) | | Gel dentifrício (mg/mL) | |
| | | Contendo extratos vegetais | Não contendo extratos vegetais | Contendo extratos vegetais | Não contendo extratos vegetais |
| <i>S. aureus</i> | 9,44 | 2500,0 | 1250,0 | 25,0 | 25,0 |
| <i>B. subtilis</i> | 9,44 | 625,0 | 625,0 | R | R |
| <i>P. aeruginosa</i> | 37,75 | 1250,0 | 2500,0 | R | R |
| <i>E. coli</i> | 37,75 | 2500,0 | 1250,0 | R | R |
| <i>E. faecalis</i> | 18,87 | 2500,0 | 1250,0 | 25,0 | 25,0 |

R: resistente

Alguns trabalhos já foram realizados utilizando as mesmas espécies vegetais; dentre eles Cowan (1999) também mostrou a atividade antimicrobiana de *R. officinalis* (alecrim) e de *A. millefolium* (mil-folhas). Através de um trabalho de revisão o autor mostra a atividade antimicrobiana de várias espécies vegetais, relacionando as classes de substâncias químicas presentes em extratos obtidos com diferentes solventes (água destilada, metanol e etanol). O autor faz menção ao óleo essencial do alecrim e sua atividade sobre bactérias Gram-positivas e negativas, vírus, fungos e protozoários, atribuindo a mesma principalmente aos terpenóides. E ainda apresenta atividade sobre vírus e helmintos para a *A. millefolium* (mil-folhas).

Nascimento et al. (2000), propõem a utilização de associação de antibióticos e extratos vegetais, sobre bactérias resistentes, evidenciando a ocorrência de sinergismo,

possibilitando, assim, que antibióticos, individualmente ineficazes, apresentassem ação sobre estas bactérias. Os autores avaliaram a atividade de extratos etanólicos de *R. officinalis* (alecrim) e *A. millefolium* (mil-folhas) associados à antibióticos, sobre microrganismos resistentes. Foi observado que os extratos apresentaram atividade sobre os microrganismos quando utilizados isoladamente e quando associados em pequenas concentrações aos referidos antibióticos.

SÖKMEN et al. (2003) apresentam resultados importantes da atividade de outra espécie do gênero *Achillea* sobre microrganismos, incluindo fungos (duas espécies diferentes) e bactérias (doze espécies diferentes), através da avaliação do extrato metanólico da planta.

Moraes et al. (2000) estudaram a atividade antimicrobiana de extratos e de óleos essenciais, obtidos a partir de *A. millefolium* (mil-folhas), ambos foram submetidos ao estudo de atividade antimicrobiana, frente a *S. aureus*, *E. coli* e *P. aeruginosa*. Os derivados de *A. millefolium* apresentaram importante atividade antimicrobiana frente ao *S. aureus*.

Um estudo comparativo sobre a atividade antimicrobiana do óleo essencial de *R. officinalis* (alecrim), *Artemisia afra* e *Pteronia incana*, observou sua ação sobre bactérias e fungos selecionados. Os efeitos apresentados por *R. officinalis* (alecrim) e *Artemisia afra* foram similares e mais intensos que os efeitos apresentados por *Pteronia incana* (SEREITI et al., 1999).

Outros autores têm demonstrado que *R. officinalis* (alecrim) apresenta propriedades cicatrizantes e antimicrobianas em uso tópico, contra *Staphylococcus* e *Monilia*, e outras espécies de fungos e bactérias, devido à composição química. A tintura tem sido usada em bochechos, contra o mau hálito (MATOS 2000; PORTE & GODOY, 2001; LORENZI & MATOS, 2002).

Koyama et al. (2000), mostraram que as cascas de *T. impertiginosa* (ipê roxo) têm sido muito utilizadas popularmente por sua ação antimicrobiana (antifúngica e antibacteriana) e antiinflamatória. Foram isolados dois novos compostos do extrato metanólico da planta (dialdeídos ciclopentenos), que apresentaram atividade em estudos iniciais.

São ainda registrados dados sobre a atividade antimicrobiana de *P. major* (tanchagem) segundo Holets et al. (2002). Os autores realizaram a avaliação da atividade antimicrobiana de treze espécies vegetais popularmente utilizadas no Brasil, avaliando a sensibilidade de microrganismos (bactérias e fungos) através da determinação da CIM para os extratos hidroalcoólicos de *P. major*.

Outro estudo microbiológico para a avaliação da atividade dos extratos hidroalcoólico e clorofórmico de *P. major* (tanchagem) foi realizado frente a 12 cepas de *S. aureus*, obtidas

de lesões de pele, secreções vaginais e da orofaringe. Estes microrganismos mostraram-se resistentes ao extrato clorofórmico e sensíveis ao extrato hidroalcoólico (FREITAS et al., 2000).

Semelhantemente aos trabalhos citados, nossos resultados demonstraram atividade antibacteriana para as espécies vegetais consideradas (*N. officinale*, *R. officinalis*, *T. impetiginosa*, *A. millefolium* e *P. major*) contra *S. aureus*, *B. subtilis*, *E. coli*, *E. faecalis* e *P. aeruginosa*.

Não houve diferença significativa com relação à atividade antibacteriana entre as formulações contendo extratos vegetais e as formulações sem extratos, tanto para o gel dentifrício como o enxaguatório bucal. O gel dentifrício apresentou atividade superior ao enxaguatório bucal, provavelmente devido aos componentes da formulação. Contudo, a mistura de extratos apresentou atividade importante antibacteriana, o que justifica sua utilização com esse fim.

5.7. Avaliação da atividade antiinflamatória

A avaliação da atividade antiinflamatória se deu através do estudo de edema de pata em ratos, induzido por carragenina. Os animais receberam injeção de carragenina, na planta da pata e as medições se deram através de um espessímetro, segundo descrição do método.

Os resultados mostram que não houve inibição da inflamação, estatisticamente significativa, quando comparados os dados obtidos do grupo de animais que recebeu a mistura de extratos (tratado) por via intraperitoneal e o grupo de animais que recebeu DMSO (controle). Contudo pode-se observar pequena redução da inflamação como mostra o gráfico a seguir (Figura 15).

Do ponto de vista biológico, os dados encontrados são importantes, já que se tratam de extratos brutos e injeção intraperitoneal dos mesmos, existindo a possibilidade de ocorrência de várias interações. Além disso, a atividade apresentada pela mistura de extratos, apesar de pouco intensa, pode contribuir para a melhoria da saúde bucal, já que a gravidade da inflamação causada pela carragenina na pata dos ratos, não ocorre com a mesma magnitude da inflamação encontrada na cavidade oral .

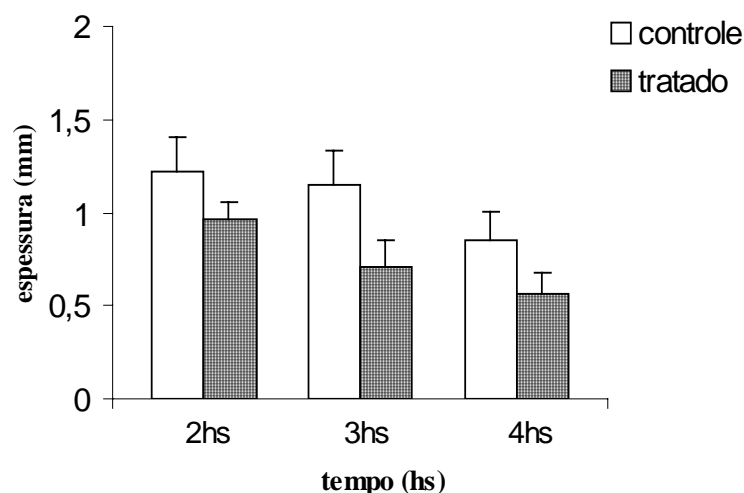


Figura 15 - Representação da avaliação da atividade antiinflamatória *in vivo*, $p > 0,05$.

Neves et al. (2000) estudaram a atividade antiedematogênica e analgésica do extrato hidroalcoólico bruto de *R. officinalis* L. (Alecrim), em edema de pata em ratos. O edema foi induzido através de injeção subplantar dos agentes inflamatórios e o efeito analgésico pôde ser avaliado através de contorções abdominais induzidas pelo ácido acético. Os resultados permitiram concluir que o extrato possui atividade antiedematogênica e analgésica.

Barnes (2002), tem revelado dados sobre a atividade antiinflamatória do extrato aquoso de *A. millefolium* em estudos utilizando camundongos e ratos, através da avaliação do edema de pata induzido por substâncias inflamatórias. E ainda, a atividade antiinflamatória tópica, do referido extrato, também tem sido documentada.

Comparando-se os resultados com os dados encontrados na literatura pode-se sugerir que a mistura de extratos tenha reduzido o potencial antiinflamatório das espécies vegetais consideradas isoladamente.

5.8. Avaliação da atividade imunológica

O sistema imunológico é um notável sistema de adaptação para defesa que evoluiu nos vertebrados para protegê-los de agressões externas, microrganismos patogênicos invasores e do câncer. É capaz de gerar um grande número de células e moléculas que podem especifica

ou inespecificamente reconhecer e eliminar uma variedade, aparentemente ilimitada, de agentes invasores. Estas células e moléculas agem conjuntamente em uma rede dinâmica primorosamente adaptável, cuja complexidade somente se assemelha à do sistema nervoso (GOLDSBY et al., 2000).

O termo imunomodulação pode ser definido como uma modificação da resposta imunológica ou da função do sistema imune através da ação de agentes estimulantes ou supressores (LOPES, 2004).

A medicina popular chinesa considerou que certas ervas seriam úteis na estimulação ou supressão do sistema imunológico. Nas últimas duas décadas, pesquisadores deram grande atenção ao mecanismo de ação dessas ervas e no entendimento da imunomodulação (HUANG, 1999).

As substâncias produzidas pelas plantas, na tentativa de se adaptarem às agressões do meio ambiente, possuem potencial imunomodulador. Essas substâncias podem ser flavonóides, indóis, fitosteróis, polissacarídeos, sesquiterpenos, alcalóides, glucanas, taninos, vitaminas e minerais que agem como antioxidantes e coenzimas, além de muitas outras (WILLIAMS, 2001).

Uma imunidade efetiva não se dá simplesmente pela interação de uma molécula de antígeno com o linfócito contendo seu receptor específico, mas envolve ainda interações celulares que ocorrem após a apresentação do antígeno pelas células fagocitárias. Os macrófagos constituem-se em uma das principais células fagocitárias do sistema imunológico e são as primeiras a serem ativadas para participar de uma resposta imunológica propriamente dita, quando o organismo é confrontado por fatores exógenos, como por exemplo, bactérias, vírus, veneno e células cancerígenas. Parte de sua efetividade se deve à produção de óxido nítrico (NO), peróxido de hidrogênio (H₂O₂) e outros reativos intermediários do nitrogênio (RNI), bem como fagocitose de partículas estranhas (LOPES, 2004).

Os macrófagos estão envolvidos em todas as fases da resposta imune (ROITT et al., 1999). Possuem mecanismos para reconhecer e reagir a patógenos, o que os torna células importantes da imunidade inata. Eles também cooperam com os linfócitos para desenvolver respostas imunes adaptativas (PARHAM, 2001).

Toda vez que se deparam com certos estímulos, os macrófagos sofrem um processo conhecido como ativação, caracterizado por um rápido aumento no metabolismo, motilidade e atividade fagocítica. Os macrófagos ativados, porém, não funcionam apenas como fagócitos. Essas células também secretam mais de cem produtos, dentre eles enzimas, componentes do complemento, fatores de coagulação, espécies reativas do oxigênio, citocinas, etc. (LOPES,

2004). São importantes como células inflamatórias, tumorocidas e microbicidas, pois a destruição de muitos parasitas intracelulares e de algumas células tumorais requer a ativação de macrófagos (ROITT et al., 1999).

Os aspectos da fisiologia dos macrófagos são influenciados de alguma forma pelo lipopolissacarídeo (LPS), um produto das bactérias Gram-negativas. O LPS induz um aumento do consumo de glicose e oxigênio e a célula adquire a capacidade de matar microrganismos. Os macrófagos também desenvolveram um mecanismo refinado para reconhecer LPS no ambiente e, portanto, ele é um dos mais potentes estimuladores de macrófagos (LOPES, 2004).

Fagócitos, neutrófilos e macrófagos produzem espécies reativas de oxigênio (ERO) durante a fagocitose ou devido à estimulação com vários agentes, através da ativação do complexo NADPH (nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato reduzida) oxidase (FORMAN & TORRES, 2001). Os radicais derivados do oxigênio liberados pelos macrófagos são capazes de oxidar membranas celulares e também de formar pontes dissulfeto entre os aminoácidos cisteína de diversas proteínas estruturais, levando à morte da bactéria (MOTTA JÚNIOR, 2004).

A geração fisiológica de ERO está relacionada com diversas respostas fisiológicas, desde a ativação transcricional até a proliferação celular e apoptose (FORMAN & TORRES, 2001). Em resposta à ativação de macrófagos por mediadores inflamatórios solúveis específicos, é observada a ocorrência de um aumento de 2-20 vezes no consumo de oxigênio e aumento do metabolismo da glicose (DRATH & KARNOUSKY, 1975; BABIOR, 1978; BEUTLER et al., 1985). O consumo transitório de oxigênio é considerado um evento crítico para ação bactericida dos fagócitos. Durante esse período ocorre redução do oxigênio (O_2) a ânion superóxido (O_2^-). O O_2^- gerado é convertido a H_2O_2 com a ajuda da enzima superóxido dismutase (SOD) (PICK & KEISARI, 1980; PICK & MIZEL, 1981; ROITT & DELVES, 1997; ROTT et al., 1999). O peróxido de hidrogênio possui uma variedade de papéis no corpo humano. Atua como molécula sinalizadora e um agente citotóxico no sistema de defesa (CLEMENT et al., 1998; ABE & BRADFORD, 1999; HALLIWEL et al., 2000; FORMAN & TORRES, 2002).

A resposta mediada por células é efetiva em eliminar viroses, fungos, micobactérias, células tumorais e rejeições teciduais (LOPES, 2004). A morte de um patógeno (intracelular ou extracelular) por fagócitos é devida em parte pela produção de radicais livres como: peroxinitrito, superóxido, radicais hidroxil e possivelmente oxigênio molecular singlet (O_2^-) (MAHDI et al., 1992).

O NO possui uma grande variedade de funções e atua em muitos processos fisiológicos, entre eles na regulação do sistema imune (HALLIWEL & GUTTERIDGE, 1984). Além disso, essa molécula também faz parte do arsenal de primeira defesa do organismo com poder microbicida. Está demonstrada sua ação antibacteriana, antiviral e antiparasitária (FLORA FILHO & ZILBERTEIN, 2000).

O óxido nítrico (NO) é formado através da oxidação do átomo de nitrogênio do aminoácido L-arginina pela enzima óxido nítrico sintase (NOS), logo em seguida, se transforma em nitrito (NO₂⁻). Esta enzima pode apresentar-se em três isoformas: a constitutiva endotelial (e-NOS), a constitutiva neuronal (n-NOS) e uma óxido nítrico sintase induzível (i-NOS). Em macrófagos a iNOS é cálcio independente e sua atividade é induzida por citocinas, como o fator de necrose tumoral-alfa (TNF- α) (DRAPIER et al., 1988; HIBBS et al., 1992; SCHINDLER & BODGAN, 2001).

Atualmente, já está bem estabelecido que o NO tem um duplo papel no processo inflamatório. O NO secretado em altos níveis por macrófagos ativados é importante na defesa contra microrganismos (MacMICKING et al., 1997). Contudo, um controle apropriado da homeostase do NO faz com que esse mediador seja um sinal útil em um certo evento fisiológico ou, por outro lado seja citotóxico devido a uma geração excessiva (ACHIKE & KWAN, 2003).

5.8.1. Viabilidade celular

Os estudos de atividade biológica dos extratos das plantas sobre o sistema imunológico foram iniciados com os testes de viabilidade. Uma vez que as células são retiradas do seu ambiente natural *in vivo* e entram em contato com substâncias a serem estudadas, a questão da viabilidade é fundamental, principalmente durante o desenvolvimento das manipulações experimentais, assegurando dessa forma a capacidade de uma determinada população celular responder a vários estímulos, quaisquer que sejam eles (FRESHNEY, 1994). Em relação aos extratos estudados, a viabilidade celular para macrófagos, foi baseada na capacidade dos macrófagos de reduzirem o MTT. O DMSO, utilizado como solvente para o preparo das soluções, é citotóxico para os macrófagos. Segundo Lopes (2004) a concentração de 4% de DMSO apresentou viabilidade celular próxima a 100% desse modo todas as preparações obtidas a partir dos extratos das plantas em estudo possuíam no máximo 4% de DMSO. A

determinação da viabilidade celular tem como objetivo observar o potencial citotóxico dos extratos. Os resultados obtidos são os mostrados a seguir (Figuras 16-18).

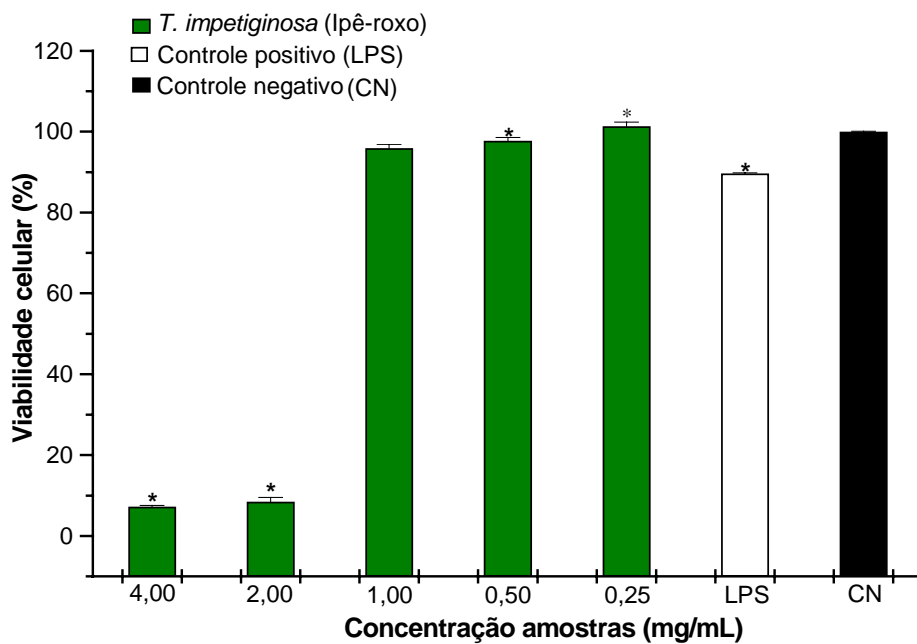
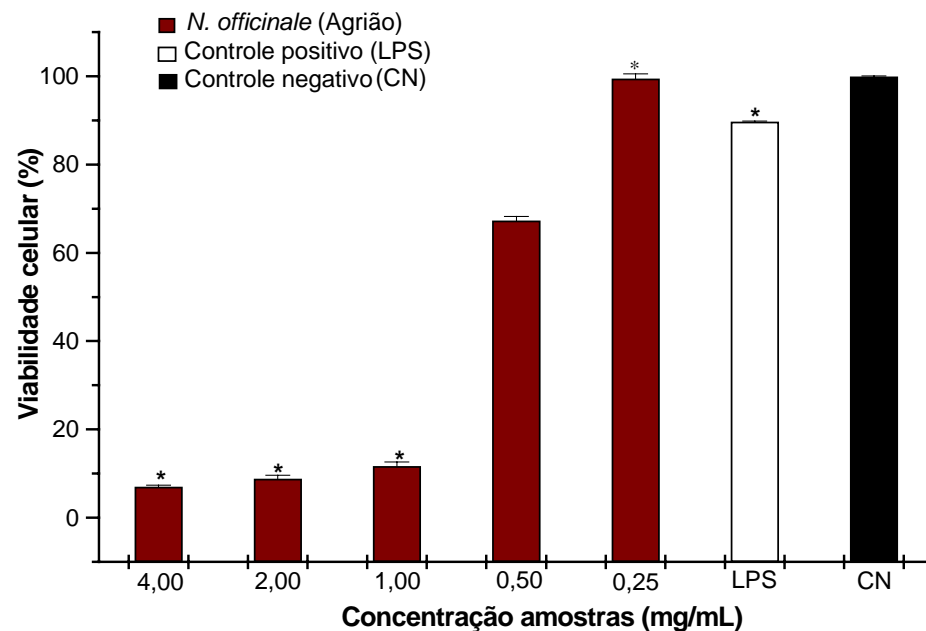


Figura 16 - Viabilidade de macrófagos peritoneais murinos em presença de diferentes concentrações do extrato hidroalcoólico de *N. officinale* (acima), e *T. impetiginosa* (abaixo), * $p < 0,01$ quando comparado ao controle negativo.

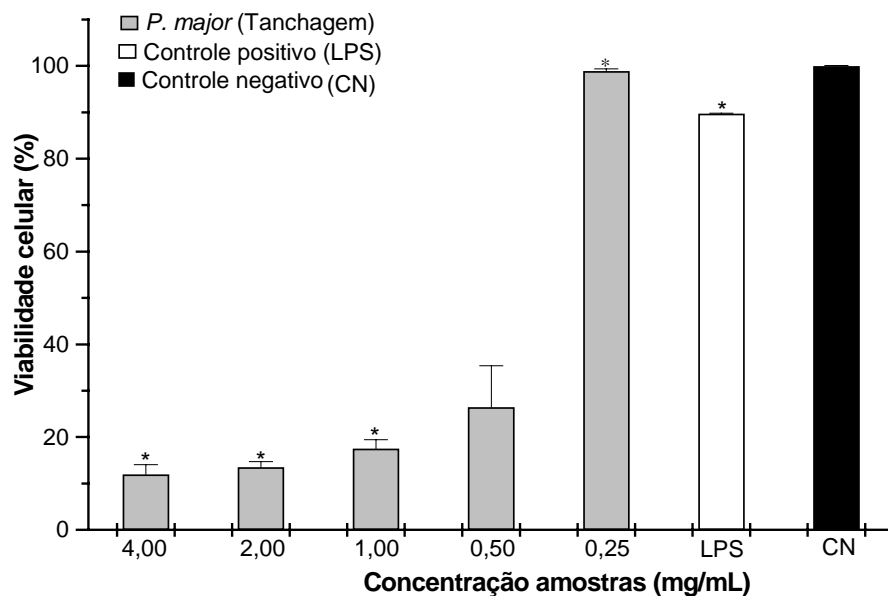
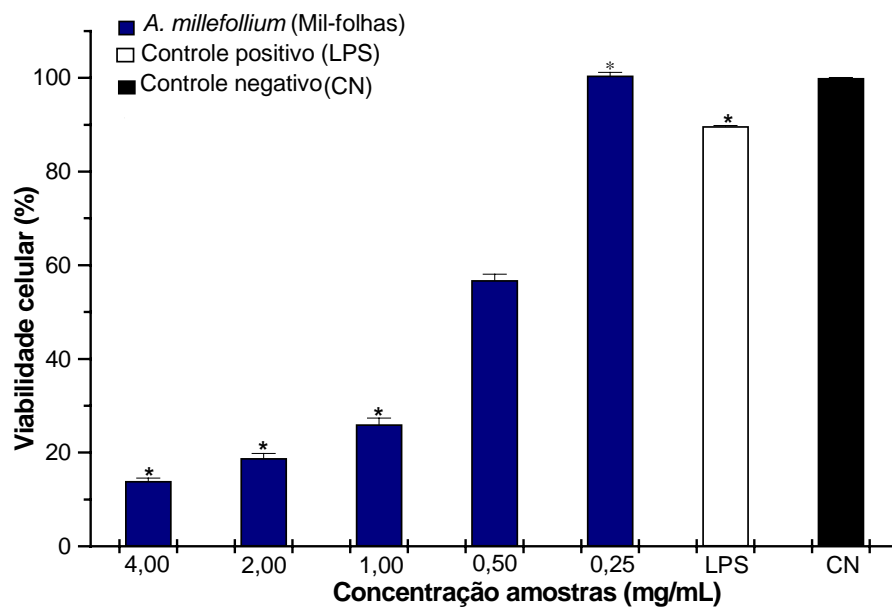


Figura 17 - Viabilidade de macrófagos peritoneais murinos em presença de diferentes concentrações do extrato hidroalcoólico de *A. millefolium* (acima) e de *P. major* (abaixo), * p<0,01 quando comparado ao controle negativo.

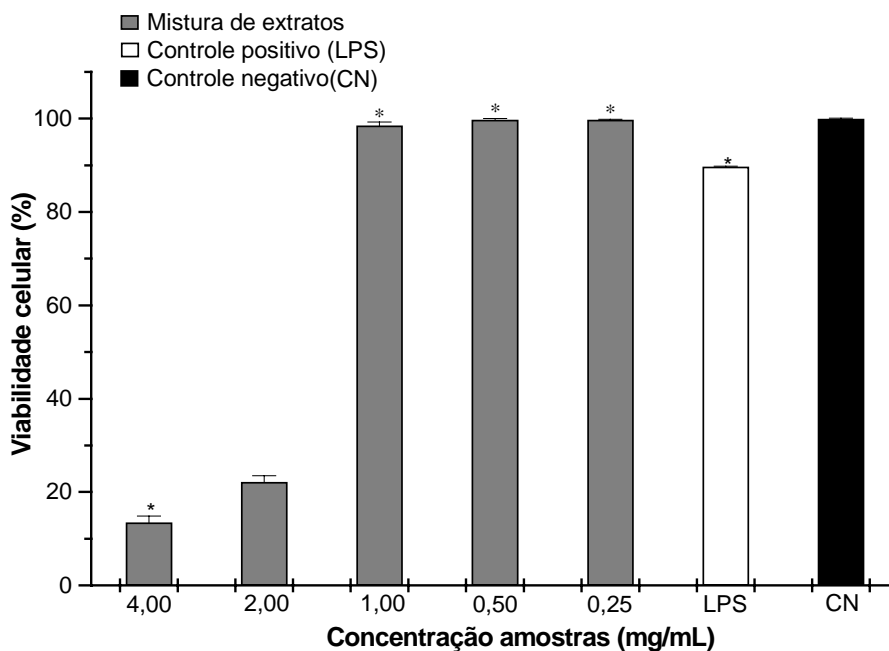
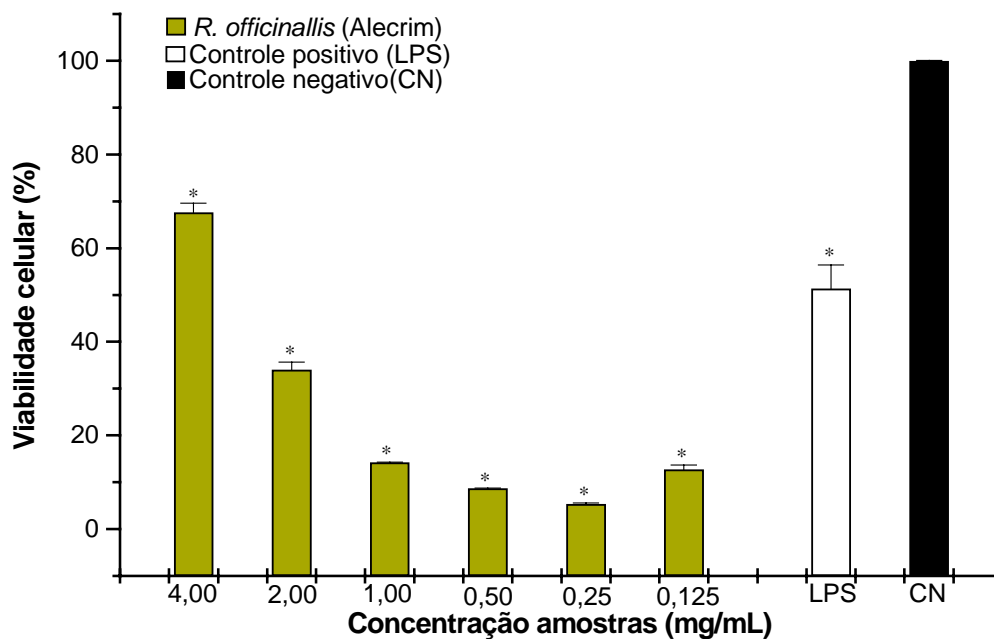


Figura 18 - Viabilidade de macrófagos peritoneais murinos em presença de diferentes concentrações *R. officinalis* (acima) e da mistura dos extratos hidroalcoólicos das espécies vegetais (abaixo), * $p < 0,01$ quando comparado ao controle negativo.

Observando os resultados, as concentrações escolhidas para a realização dos estudos de liberação de H_2O_2 e NO foram de 0,25mg para *N. officinale* (agrião), para *T. impetiginosa* (ipê roxo), *A. millefolium* (mil-follas) e *P. major* (tanchagem), para a mistura de extratos hidroalcoólicos a concentração de escolha foi de 1,0mg/mL e para *R. officinalis* (alecrim) foi de 4,0mg/mL. Em todas essas concentrações a viabilidade celular apresentada pelos macrófagos está perto de 100%, exceto para o *R.officinalis*, que apresentou uma resposta de viabilidade celular atípica: à medida que sua concentração era diminuída, o mesmo se tornava mais citotóxico para os macrófagos. Por esse motivo os experimentos foram repetidos e ainda foi realizado um estudo de viabilidade utilizando o vermelho neutro ao invés do MTT, através do qual os resultados se confirmaram. Como a concentração de 4,0mg apresentou a melhor viabilidade em relação as outras concentrações, ela foi escolhida para a realização dos demais estudos, mesmo não sendo esta próximo a 100%. Sugerimos que maiores investigações devam ser realizadas com o intuito de se esclarecer o comportamento apresentado pelo extrato de *R.officinalis* (alecrim).

5.8.2. Determinação da liberação de peróxido de hidrogênio (H_2O_2)

Os extratos das plantas induziram a produção de H_2O_2 , porém não de maneira intensa, exceto o *R.officinalis*, que apresentou o maior estímulo, na concentração em estudo (Figura 19).

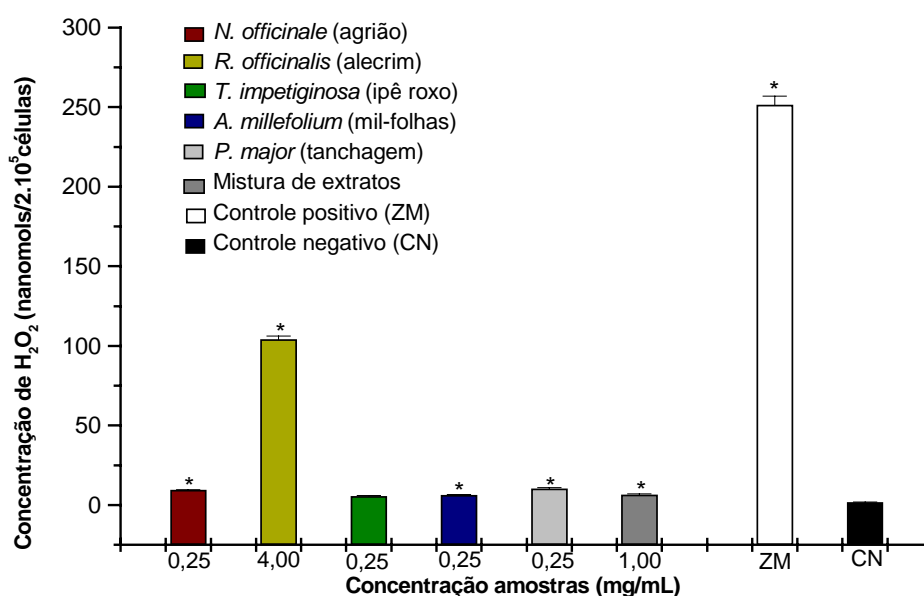


Figura 19 - Produção de peróxido de hidrogênio (H_2O_2) em cultura de macrófagos peritoneais murinos em presença dos diferentes extratos, * $p < 0,01$ quando comparado ao controle negativo.

O perfil de resposta para os extratos em estudo com relação a liberação de H_2O_2 foi semelhante entre si e indicou um baixo estímulo. Já o extrato de *R. officinalis* (alecrim) apresentou maior estímulo de liberação. E ainda observa-se que a mistura de extratos também apresentou resposta semelhante à resposta dos extratos separados, mesmo contendo em associação o extrato de *R. officinalis* (alecrim). Este fato indica a possível ocorrência de interações das substâncias contidas no extrato de *R. officinalis* com as substâncias dos demais extratos, que poderiam estar diminuindo a capacidade de estimulação de H_2O_2 , daquele.

5.8.3. Determinação da liberação de óxido nítrico (NO)

Os extratos das plantas induziram a produção de NO, nas concentrações estudadas, porém em diferentes intensidades em relação a cada espécie vegetal (Figura 20).

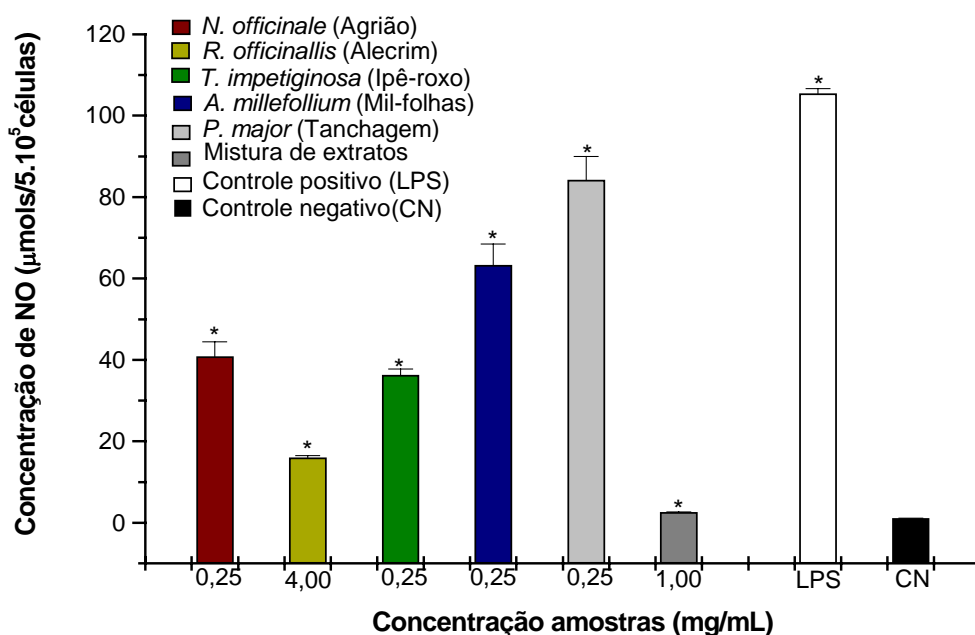


Figura 20 - Produção de óxido nítrico (NO) em cultura de macrófagos peritoneais murinos em presença dos diferentes extratos, * $p < 0,01$ quando comparado ao controle negativo.

Observamos que para a mistura de extratos o estímulo foi menor, quando comparado aos estímulos dos extratos avaliados separadamente, o que também indica a ocorrência de interação entre as substâncias contidas nos mesmos

O NO é uma molécula crucial para muitas funções fisiológicas e a sua liberação inapropriada está ligada a numerosas patologias. Neste estudo foi possível observar a produção de NO, ocasionada principalmente com as espécies *P. major* (tanchagem) e *A. millefolium* (mil-folhas), havendo ainda estímulo considerável pelo *N. officinale* e *T. impetiginosa*; contudo pelo *R. officinalis* (alecrim) a liberação de NO foi pequena.

O conhecimento existente do papel do NO nos estados fisiológicos e patofisiológicos abriu uma gama de possibilidades, especialmente no entendimento dos mecanismos de ação dos medicamentos que modulam a ação desse mediador (ACHIKE & KWAN, 2003). Agentes que modulem a atividade do NO podem ter considerável valor terapêutico (HOBBS et al., 1999).

Grande atenção tem sido dada à molécula de óxido nítrico atualmente, sendo que vários experimentos utilizando extratos, frações ou substâncias puras obtidas de plantas mostraram interferir com a produção de óxido nítrico. Esses e outros exemplos mostram o imenso potencial dos compostos isolados de plantas na descoberta de novos medicamentos (LOPES, 2004).

Flores et al. (2000) avaliaram a atividade imunológica do extrato metanólico das folhas de *P. major* (tanchagem), observando estímulo da produção de NO por macrófagos de ratos. Os autores também utilizaram o LPS como controle positivo para a ativação dos macrófagos.

Lopes et al. (2003) observaram estímulo na produção de NO, avaliando o extrato etanólico e o óleo essencial de *A. millefolium* (mil-folhas) sobre macrófagos de camundongos. Ambos apresentaram atividade estimuladora, em várias concentrações quando comparadas ao LPS. O extrato bruto, preparado em etanol 70°GL, diluído em DMSO, apresentou produção de NO maior nos extratos mais concentrados.

Liu et al. (1999) verificaram que a substância β -lapachona, obtida a partir do lapachol extraído da espécie *T. impetiginosa*, foi capaz de inibir a expressão e a função da iNOS em presença de macrófagos de ratos, quando a mesma era induzida pelo LPS. Os dados sugerem que β -lapachona possui um importante potencial anti-inflamatório. Neste caso, sugere-se que para o ipê roxo, a atividade antiinflamatória poderá ser acentuada se forem utilizadas substâncias isoladamente, por exemplo, β -lapachona. Na época da floração, é possível que, a produção de substâncias ativas da espécie esteja ocorrendo, ou tenha sido acumulada, nas

flores, já que a árvore não apresenta folhas nesse período. Hipoteticamente a rota de formação do lapachol e demais substâncias pode se restringir em pequena escala as flores e ramos, se distribuindo para o caule e cascas, onde se concentram.

Lo et al. (2002) verificaram a inibição de liberação de NO pelo carnosol, composto químico isolado da espécie *R. officinalis*. Através da avaliação de macrófagos murinos, os autores observaram que o carnosol, suprimiu a produção de NO e a expressão de iNOS, induzida por LPS. Da mesma maneira, sugere-se que a atividade antiinflamatória do alecrim, poderá ser acentuada se forem utilizadas substâncias ativas isoladas, como por exemplo carnosol.

5.8.4. Determinação de TNF- α

Os extratos das plantas induziram a produção de TNF- α , nas concentrações estudadas, porém em diferentes intensidades em relação a cada espécie vegetal (Figura 21).

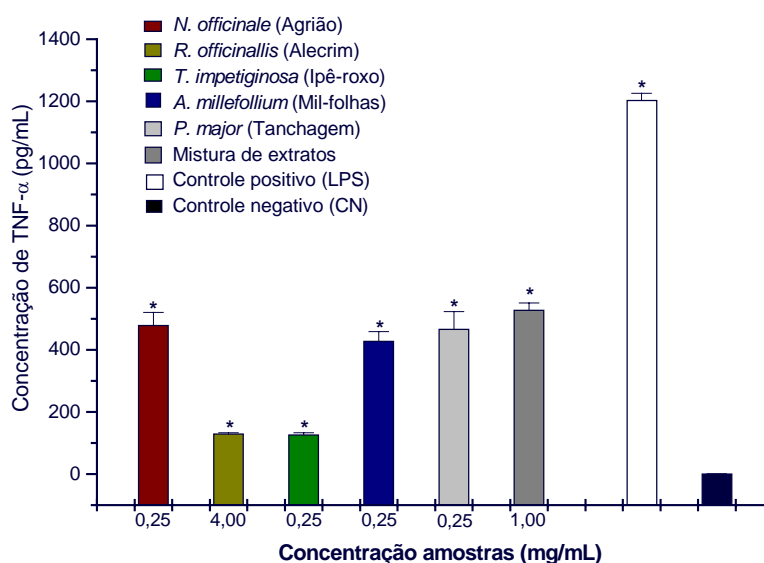


Figura 21 - Produção de fator de necrose tumoral alfa TNF- α em cultura de macrófagos peritoneais murinos em presença dos diferentes extratos, * $p < 0,01$ quando comparado ao controle negativo.

O TNF- α é uma citocina que possui importantes efeitos biológicos em uma variedade de células, na maioria relacionados a processos imunomodulatórios (LOPES, 2004).

Apesar de representarem um campo de estudos relativamente novo, os produtos naturais obtidos de plantas constituem uma rica e promissora fonte de novas moléculas com propriedades imunomodulatórias (WILLIAMS, 2001).

A imunomodulação utilizando plantas pode proporcionar uma alternativa à terapia convencional, sendo necessária em uma variedade de doenças, especialmente quando os mecanismos de defesa do hospedeiro precisam ser ativados devido ao mau funcionamento do sistema imunológico, ou ainda quando é necessária uma inibição, como no caso das doenças auto-imunes (LOPES, 2004).

A avaliação da estimulação de macrófagos foi realizada por três experimentos: produção de H₂O₂, NO e TNF- α em cultura de macrófagos peritoneais de camundongos Swiss. Através da análise dos resultados, é possível sugerir que os extratos hidroalcoólicos das espécies vegetais, *N. officinale* (agrião), *R. officinalis* (alecrim), *T. impetiginosa* (ipê roxo), *A. millefolium* (mil-folhas) e *P. major* (tanchagem), apresentaram atividade imunomoduladora nas concentrações estudadas. Foi observado que a mistura dos extratos brutos produziu diminuição da atividade biológica.

A progressão das periodontites está relacionada com uma complexa resposta inflamatória e imunológica (KINANE & LAPPIN, 2002). Se as doenças periodontais são causadas por microrganismos, pode-se esperar que o hospedeiro irá preparar uma resposta imunológica às espécies agressoras. Isto, realmente, parece ser o caso onde diversos estudos, indicam que indivíduos com doenças periodontais destrutivas demonstram uma titulação sérica elevada de anticorpos para microrganismos subgingivais específicos. É uma característica comum de muitas doenças infecciosas que uma espécie patogênica possa colonizar um hospedeiro e ainda o hospedeiro possa não manifestar aspectos clínicos da doença por períodos de tempo que variam de semanas a décadas, ou para sempre. O hospedeiro deve estar suscetível tanto sistêmica quanto localmente. Por um período de tempo mais longo do que a pesquisa dos agentes etiológicos das doenças periodontais, tem-se sugerido várias hipóteses sobre as diferenças no padrão da doença ou na sua gravidade, que poderiam existir devido às diferenças na suscetibilidade do hospedeiro. As reações inflamatórias e imunológicas ao biofilme bacteriano representam as características predominantes da gengivite. O biofilme bacteriano é essencial para o processo patológico e a resposta do hospedeiro a esta agressão sofre grandes variações. A resposta imune é a fonte mais provável de variação do hospedeiro e, portanto, um fator importante na etiopatogênese da doença periodontal (LINDHE, 1999).

5.9. Estudos clínicos

A avaliação dos exames clínicos considerou a observação dos Índice de Placa (IP), Índice Gengival (IG), Recessão Gengival (RG), Profundidade de Sondagem (PS) e Sangramento à Sondagem (SS). Os nove (9) voluntários participantes dos estudos clínicos, concluídos até o momento, possuem idade entre 21 e 47 anos, sendo a média de 34 anos, destes, 5 são do sexo masculino e 4 do sexo feminino.

Na avaliação do Índice de Placa, foi verificada a presença ou não de biofilme dentobacteriano (placa) nos sítios observados. Os dados apontam para uma significativa redução do Índice de Placa obtida com o gel dentifrício contendo extratos vegetais, quando comparada à redução obtida pelo uso do gel dentifrício sem extratos vegetais (controle) (Figura 22).

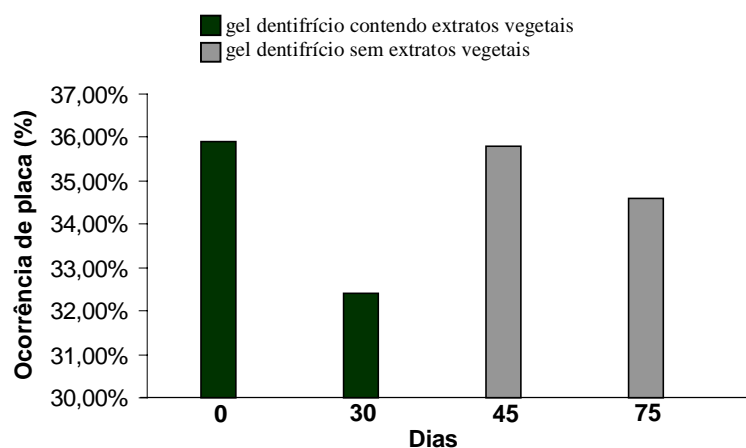


Figura 22 - Índice de Placa (%) determinado com os estudos clínicos

Adicionalmente a condição gengival foi avaliada pela presença ou ausência de sangramento, através da aplicação do Índice de Sangramento Gengival. A redução deste índice observada com o uso do gel dentifrício contendo extratos vegetais foi superior à redução observada com o uso do produto controle (Figura 23).

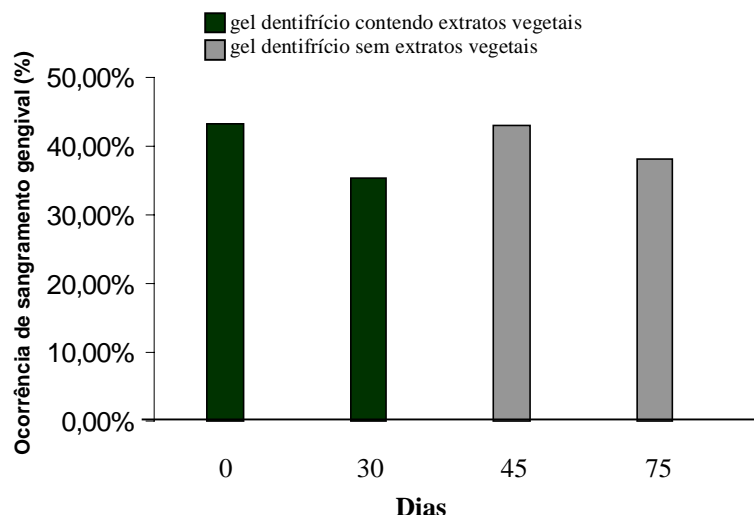


Figura 23 - Índice de sangramento gengival (%) determinado com os estudos clínicos

Os dados iniciais obtidos nos estudos clínicos confirmam o apresentado por Trenizani (2002) que observou alteração da diversidade dos microrganismos presentes no biofilme dento-bacteriano e redução do índice gengival, em pacientes que fizeram uso do gel dentifrício contendo a mesma mistura de extratos vegetais (*N. officinale*, *R. officinalis*, *T. impetiginosa*, *A. millefolium* e *P. major*).

Os estudos clínicos estão sendo finalizados e os resultados iniciais indicam a possibilidade das formulações propostas possuírem potencial para serem utilizadas como adjuvantes na prevenção e no tratamento de doenças periodontais.

Ao término da avaliação clínica o paciente participou de um questionário técnico solicitando ao mesmo, informações relativos à aceitação do produto. Os gráficos apresentados na Figura 24, ilustram a opinião dos participantes.

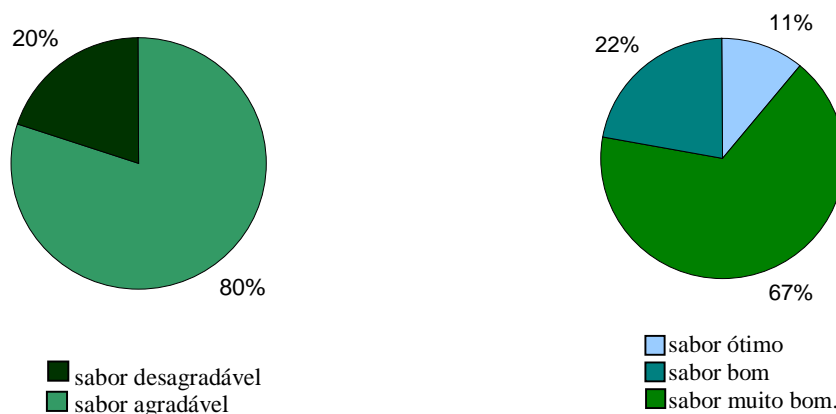


Figura 24 - Dados sobre a opinião dos participantes dos estudos clínicos quanto à aceitação do produto

Os parâmetros considerados (como sabor, odor, sensorial, refrescância e aspecto) indicaram que 80% dos participantes acharam o gel dentifrício agradável de ser utilizado e 20% possuíam opinião contrária, devido a pouca sensação de frescor obtida e pouca formação de espuma em relação aos produtos comerciais. Ainda, 11% consideraram sabor ótimo para o produto, 67% consideraram o sabor muito bom, 22% consideraram o sabor bom e nenhum paciente considerou o sabor ruim. Do total de participantes, 100% utilizaria o produto se o mesmo fosse comercializado, contudo 20% sugeriram aumento da refrescância e formação de espuma. Os dados obtidos são importantes pois geraram condições favoráveis à aceitação do gel dentifrício quanto à cor, odor, sabor, refrescância e aspecto.

CONCLUSÕES

6. CONCLUSÕES

Após a realização dos estudos, os dados obtidos permitem chegar as seguintes conclusões:

- os resultados farmacognósticos estão de acordo com o histórico das drogas vegetais estudadas;
 - os estudos de pré-formulação foram importantes para definir a fórmula de enxagüatório bucal, a qual apresentou aspectos farmacêuticos satisfatórios;
 - as condições microbiológicas dos produtos obtidos e da mistura de extratos vegetais, estão de acordo com as definições apresentadas pelo CTFA e pela RDC nº17/2000;
 - os extratos vegetais apresentaram atividade principalmente sobre bactérias Gram-positivas (*S. aureus* e *B. subtilis*); não houve diferença significativa entre a atividade antibacteriana das formulações contendo extratos vegetais e as formulações sem extratos, tanto para o gel dentifrício, como para o enxagüatório bucal;
 - observou-se que a avaliação da citotoxicidade dos extratos vegetais é dependente da concentração, em cultura de macrófagos peritoneais murinos; os extratos induziram a liberação de NO, H₂O₂ e TNF- α ;
 - os estudos clínicos apontam para uma atividade promissora das formulações a serem empregadas como adjuvante para a prevenção e o tratamento de doenças periodontais.
-

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABE, J.; BRADFORD, B.C. Fyn and JAK2 mediate ras activation by reactive oxygen species. **J. Biol. Chem.** Bethesda, v.274, n.30, p.21003-21010, 1999.

ACHIKE, F.I.; KWAN, C.Y. Nitric oxide, human diseases and the herbal products that affect the nitric oxide signaling pathway. **Clin. Exp. Pharmacol. Physiol.** Carlton, v.30, p.605-615, 2003.

ALMEIDA, E. R. de. **Plantas Medicinais Brasileiras: Conhecimentos Populares e Científicos.** São Paulo: Hemus Editora, 1993. 341p.

AMERICAN ACADEMY OF PERIODONTOLOGY. **Periodontal (Gum) Diseases.** Disponível em: <http://www.perio.org/consumer/2a.html>. Acesso em 15 out. 2004.

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE ODONTOLOGIA. **Norma ABO nº 1.** Dentifrícios. 1999. 16p.

BABIOR, B.M. Oxygen-depent microbial killing by phagocytes. **N. Engl. J. Med.** Waltham, v.298, p.659-668, 1978.

BALLVÉ, A.C.; SIQUEIRA, N.C.S. de; MENTZ, L.A.; SILVA, G.A. de A.B.; DEUD JOSÉ, K.F. **Plantas Medicinais de Uso Popular: Atlas Farmacognóstico.** Canoas: Ed. da ULBRA, 1995. 205p.

BARNES, J.; ANDERSON, L.A.; PHILLIPSON, J.D. **Herbal Medicines: A guide for healthcare professionals.** 2ed. London. Chicago: Pharmaceutical Press, 2002. p.376-378, 403-407, 489-491.

BENDAZZOLI, W.S. Fitomedicamentos: perspectivas de resgate de uma terapia histórica. **Mundo Saúde.** v.24, n.2, p.123-126, mar./abr. 2000.

BENNION, E. Higiene oral. Disponível em: <http://www.kolbe.com.br/kolbe/tecnico.htm>. Acesso em: 05 jan. 2004.

BEUTLER, B.; GREENWALD, D.; HULMES, J.D.; CHANG, M.; PAN, Y.C.E.; MATHISON, J.; ULEVITCH, R. and CERAMI, A. Identity of tumor necrosis factor and the macrophage-secreted factor cachectin. **Nature.** London, v.316, p.552, 1985.

BHASKAR, S.N. **Histologia e Embriologia Oral de Orban**. 10ed. São Paulo: Artes Médicas, 1989. 147p.

CANDAN, F.; UNLU, M.; TEPE, B.; DAFERERA, D.; POLISSIOU, M.; SÖKMEN, A.; AKPULAT, H.A. Antioxidant and antimicrobial activity of the essential oil and methanol extracts of *Achillea millefolium* subsp. *Millefolium* Afa. (Asteraceae). **J. Ethnopharmacol.** v.87, p.215-220, 2003.

CARLOS, I.Z.; ZINI, M.M.C.; SGARBI, D.B.G.; ANGLUSTER, J.; ALVIANO, C.S.; SILVA, C.L. Disturbances in the production of interleukin-1 and tumor necrosis factor in disseminated murine sporotrichosis. **Mycopathologia.** v.127, p.189-194, 1994.

CARSWELL, E.A; OLD, L.J.; KASSEL, R.L.; GREEN, S.; FIORE, N.; WILLIAMSON, B. An endotoxin-induced serum factor that causes necrosis of tumors. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v.72, p.3666-3670, 1975.

CARTURAN G. F. **Guia ABC de microbiologia: Controle microbiológico na indústria de produtos de higiene pessoal cosméticos e perfume: parâmetros, metodologia analítica e orientações**. 2.ed. São Paulo: ABC, 1999.

CLEMENT, M.; PONTON, A.; PERVAIZ, S. Apoptosis induced by hydrogen peroxide is mediated by decreased superoxide anion concentration and reduction of intracellular milieu. **Febs. Lett.**, Amsterdam, v.440, p.13-18, 1998.

CORTEZ, D.A.G.; MELLO, J.C.P. de; CARDOSO, M.L.C.; MARQUES, L.C. **Apostilas das aulas práticas**. Maringá: UEM, 2001. 40p.

COSTA, C.; COSTA, A.C.B.; SAVEDORA, C.M. S. **Fundamentos de Anatomia para o estudante de Odontologia**. São Paulo: Atheneu, 2000.

COWAN, M.M. Plant products as antimicrobial agents. **Cli. Microbiol. Rev.**, Middletown, v.12., n.4., p.564-582. Oct. 1999.

DIAS, P.C.; FOGGIO, M.A.; POSSENTI, A.; CARVELHO, J.E. de C. Antiulcerogenic activity of crude hydroalcoholic extract of *Rosmarinus officinalis* L. **J. Ethnopharmacol.** v.69, p. 57-62, 2000.

DOWD, L.E. Spectrophotometric determination of quercetin, **Anal. Chem.** v.31, n.7, p.1184-1187, 1959.

DRAPIER, J.C.; WIETZERBIN, J.; HIBBS, J.B. Interferon- γ and tumor necrosis factor induce the L-arginine-dependent cytotoxic effector mechanism in murine macrophages. **Eur. J. Immunol.**, Weinheim, v.18, p.1587-1592, 1988.

DRATH, D.B.; KARNOUSKY, M.L. Superoxide production by phagocytic leukocytes. **J. Exp. Med.**, New York, v.141, p.257-261, 1975.

EISENBERG, D.M.; DAVIS, R.B.; ETTNER, S.L.; APPEL, S.; WILKEY, S.; VAN ROMPAY, M.; KESSLER, R.C. Trends in alternative medicine use in United States, 1990-1997: results of a follow-up national survey. **JAMA**, Chicago, v.280, n. 18, p.1569-1575, 1998.

FARMACOPÉIA BRASILEIRA. 4.ed. São Paulo: Atheneu Editora, 1988.

FIGUEIREDO, C.R.L.V. de; PINTO, L.P.; LINS, R.D.A.U.; GODOY, G.P.; MEDEIROS, K.B.; ALVES, R.D. Aspectos clínicos-patológicos e etiopatogenéticos da doença periodontal: considerações atuais. **Rev. Bras. Odontol.**, v.59, n.4, p.243-246, jul./ago. 2002.

FLORA FILHO, R.; ZILBERSTEIN, B. Óxido nítrico: o simples mensageiro percorrendo a complexidade. Metabolismo, síntese e funções. **Rev. Ass. Med. Brasil.**, São Paulo, v.46, n.3, p.265-271, 2000.

FLORES, R.G.; CALDERON, C.L.; SCHEIBEL, L.W.; TAMEZ-GUERRA, P.; PADILLA, C.R.; TAMEZ-GUERRA, R.; WEBER, R.J. Immunoenhancing properties of *Plantago major* leaf extract. **Phytother. Res.** v.14, n.8, p.617-622, 2000.

FORMAN, H. J.; TORRES, M. Reactive oxygen species and cell signaling: respiratory burst in macrophage signaling. **Am. J. Respir. Crit. Care Med.**, New York, v.166, p.S4-S8, 2002.

FORMAN, H.J.; TORRES, M. Redox signaling in macrophages. **Mol. Aspects Med.**, Elmsford, v.22, p.189-216, 2001.

FREITAS, A.G.; COSTA, V.; FARIAS, E.T.N.; LIMA, M.C.A. de; XIMENES, E.A. Atividade antiestafilocócica do *Plantago major* L. In: SIMPÓSIO DE PLANTAS MEDICINAIS DO BRASIL, 16., 2000, Recife. **Anais...** Recife: Universidade Federal de Pernambuco, UFPE, 2000. p.265.

FRESHNEY, R.I. **Culture of animal cells: a manual of basic technique.** 3rded. New York: Wily-Liss, 1994. 486p.

GODA, Y.; HOSHINO, K.; AKIYAMA, I.; ISHIKAWA, T.; ABE, Y.; NAKAMURA, T.; OTSUKA, H. Constituents in watercress: inhibitors of histamine release from RBL-2H3 cells. **Biol. Pharm. Bull.**, v.22, n.12, p.1319-1326, 1999.

GOLDSBY, R.A.; KINDT, T.J.; OSBORNE, B.A.W.H. **Kuby immunology**. 4thed. New York: W. H. Freeman, 2000. 670p.

GREEN, L.G.; WAGNER, D.A.; GLOGOWSKI, J.; SKIPPER, P.L.; WISHNOK, J.S.; TANNENBAUM, S.R.. Analysis of nitrate, nitrite and [N] nitrate in biological fluids. **Anal. Biochem.**, New York, n.126, p.131-138, 1982.

HALLIWEL, B.; CLEMENT, M. V.; LONG, L. H. Hydrogen peroxide in the human body. **Febs. Lett.**, Amsterdam, v.486, p.10-13, 2000.

HALLIWEL, B.; GUTTERIDGE, J.M.C. Oxygen toxicity, oxygen radicals, transition metals and disease. **Biochem. J.**, London, v.219, p.1-14, 1984.

HARAGUCHI, H.; SAITO, T.; OKAMURA, N.; YAGI, A. Inhibition of lipid peroxidation and superoxide generation by diterpenoids from *Rosmarinus officinalis*. **Planta Med.**, v.61, n.4, p.333-336, Aug. 1995.

HARBORNE, J.B. **Phytochemical methods: a guide to modern techniques of plant analysis**. London: Chapman and Hall, 1984.

HIBBS, J.B.Jr.; WESTENFELDER, C.; TAINTOR, R.R.; VAVRIN, Z.; KABLITZ, C.; BARANOWSKI, J.H.; WARD, R.L.; MENLOVE, R.L.; McMURRY, M.P.; KUSHNER, J.P.; SAMLOWSKI, W. Evidence for cytokine: inducible nitric oxide synthesis from L-arginina in patients receiving interleukin-2 therapy. **J. Clin. Invest.**, New York, v.89, p.867-877, 1992.

HOBBS, A.J.; HIGGS, A.; MONCADA, S. Inhibition of nitric oxide synthase as a potential therapeutic target. **Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.**, Palo Alto, v.39, p.191-202, 1999.

HOLETS, F.B.; PESSINI, G.L.; SANCHES, N.S.; CORTEZ, D.A.G.; NAKAMURA, C.V.; DIAS FILHO, B.P. Screening of some plants used in the brazilian folk medicine for the treatment of infectious diseases. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v.97, n.7, p.1027-1031, out. 2002.

HUANG, K.C. **The pharmacology of Chinese Herbs**. Boca Raton: CRC Press, 1999. 512p.

-
- JORGE, L.I.F.; PREGNOLATTO, B.P.; CHICOUREL, E.L.; ZAMARIOLLI, L.A.; GRACIANO, R.A.S. Anatomia e avaliação da atividade antimicrobiana *in vitro* de mil-folhas (*Achillea millefolium* L.). **Rev. Ciênc. Farm.**, v.20, n.2, p.449-458, 1999.
- KINANE, D.F.; LAPPIN, D.F. Immune processes in periodontal disease: a review. **Ann Periodontol.**, v.7, n.1, Dec. 2002.
- KOYAMA, J.; MORITA, I.; TAGAHARA, K.; IRAI, K. Cyclopentene dialdehydes from *Tabebuia impetiginosa*. **Phytochemistry**, v.53, n.8, p.869-872, Apr. 2000
- KRIVENKO, V.V.; POTEBNIA, G.P.; LOIKO, V.V. Experience in treating digestive organ diseases with medicinal plants. **Vrach. Delo.**, v.3, p.76-78. 1989.
- LARA, E.H.G.; PANZERI, H. A contribuição da farmácia magistral na odontologia preventiva. **Revista Racine**, São Paulo, jul/ago, p.43-44. 1996.
- LINDHE J. **Tratado de periodontologia clínica**. 3ed., Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1999. 720p.
- LIU, S.H.; TSENG, H.P.; KUO, M.L.; LIN-SHIAU, S.Y. Inhibition of inducible nitric oxide synthase by beta-lapachone in rat alveolar macrophages and aorta. **BR. J. Pharmacol.** v. 126, n. 3, p.746-750, 1999.
- LÖE, H.; THEILADE, E. Experimental gingivitis in man. **J. Periodontol.**, v.36, p.177-187, 1965.
- LO, A.H.; LIANG, Y.C.; SHIAU, S.Y.S.; Ho, C.T.; LIN, J.K. Carnasol, na antioxidant in rosemary, suppresses inducible nitric oxide synthase through down-regulation nuclear factor κ -B in mouse macrophages. **Carcinogenesis**. v.23, n.6, p.983-991, 2002.
- LOESCHE, W.J.; **Cárie Dental: uma infecção tratável**. Rio de Janeiro: Editora Cultura Médica, 1993. 349p.
- LOPES, F.C.M. **Avaliação da atividade imunológica *in vitro* de *Alchornea spp* quanto à produção de peróxido de hidrogênio, óxido nítrico e fator de necrose tumoral- α por macrófagos murinos**. Dissertação (Mestrado em Análises Clínicas), Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade Estadual Paulista, Araraquara, 2004.
- LOPES, F.C.M.; PLACERES, M.P.; MOREIRA, R.R.D.; SANTOS, L.E. dos; CARLOS, I.Z. Avaliação da atividade imunológica de *Achillea millefolium* L. ("mil-folhas"). **Rev. Bras. Farmacogn.** v.14, supl., p.11-13, 2003.
-

LORENZI, H.; MATOS, F.J. de A. **Plantas Medicinais do Brasil: Nativas e Exóticas**. Nova Odessa: Instituto Plantarum de Estudos da Flora, 2002. 512p.

MABRY, T.J.; MARKHAM, K.R.; THOMAS, M.B. **Systematic identification of flavonoids**. New York: Springer Verlag, 1970. 354 p.

MacMICKING, J.; QIAO-WEN, X.; NATHAN, C. Nitric oxide and macrophage function. **Annu. Rev. Immunol.**, Palo Alto, v.15. p.323-350, 1997.

MAHDI, A.A.; CHANDER, R.; KAPOOR, N.K. Role of free radicals in plasmodium berghei infected mastomys natalensis brain. **Indian Exp. Biol.**, v.30, p.1193-1196. 1992.

MANSON, J.D.; ELEY, B.M. **Manual de Periodontia**. São Paulo: Livraria Santos, 1993. 278p.

MARCANTONIO, J.E.; SANTOS, F.A. dos. Avaliação das condições e necessidades de tratamento periodontal em escolares da zona rural, da região noroeste do estado de São Paulo, Brasil. **Rev. Odontol. UNESP**, v.27, n.2, p.449-458, jul./dez. 1998.

MARCUCCI, M.C. Propolis: chemical composition, biological properties and therapeutic activity. **Apidologie**. v.26, n.2, p.83-99. 1995.

MARTINS, E.R.; CASTRO, D.M. de; CASTELLANI, D.C.C.; DIAS, J.E. **Plantas Medicinais**. 3ed. Viçosa: UFV Editora, 2000. 220p.

MATOS, F. J. de. A. **Plantas Medicinais: Guia de seleção e emprego de plantas usadas em fitoterapia no nordeste do Brasil**. 2ed. Fortaleza: Imprensa Universitária UFC, 2000. 344p.

MESQUITA, M. **Etiologia e patogênese da doença periodontal**. 2001. Disponível em: http://www.mesquita.odo.br/t_etiolog.php. Acesso em 22 jan. 2004.

MONTEIRO, A.M.D.; ARAÚJO, R.P.C. de; GOMES FILHO, I.S. Diabetes Mellitus tipo 2 e doença periodontal. **RGO**, Porto Alegre, v.50, n.1, p.50-54, jan./mar. 2002.

MORAES, K.C.M.; LEITE, M.N.; ALVES, M.S.; YAMAMOTO, C.H. Estudo da atividade antimicrobiana de extratos e óleo essencial obtidos a partir de *Achillea millefolium* cultivada no horto de plantas medicinais da faculdade de Farmácia e Bioquímica da UFJF. In: SIMPÓSIO DE PLANTAS MEDICINAIS DO BRASIL, 16., 2000, Recife. **Anais...** Recife: Universidade Federal de Pernambuco, UFPE, 2000. p. 164.

MOSMANN, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. **J. Immunol. Methods**, v.65, p.55-63, 1983.

MOTTA JÚNIOR, C. de M. Células do sistema imune. Disponível em: <http://ioh.medstudents.com.br/imuno2.htm>. Acesso em: 17 dez. 2004.

MURRAY, P.R.; BARON, E.J.; PFALLER, M.A.; TENOVER, F.C.; YOLKEN, R.H. **Manual of Clinical Microbiology**. 8thed. Washington, DC: Asm Press, 2003. v.1 e 2. 2113p.

NAKATANI, N. Phenolic antioxidants from herbs and spices. **Biofactors**, v.13, n.1-4, p.141-146, 2000.

NASCIMENTO, G.G.F.; LOCATELLI, J.; FREITAS, P.C. Atividade de extratos vegetais e fitofármacos sobre bactérias resistentes a antibióticos. **Braz. J. Microbiol.**, v.31, n.4, p.247-256, out./dez. 2000.

NEGRAES, P. **Guia A-Z de plantas: condimentos**. São Paulo: Bei Comunicação, 2003. 267p.

NEGRAES, P. **Guia A-Z de plantas: beleza**. São Paulo: Bei Comunicação, 2003. 278p.

NEVES, M.C.L.C.; TAKATA, E.L.; SACRAMENTO, L.V.S. *Rosmarinus officinalis* L. atividade antiedematogênica e analgésica. In: SIMPÓSIO DE PLANTAS MEDICINAIS DO BRASIL, 16., 2000, Recife. **Anais...** Recife: Universidade Federal de Pernambuco, UFPE, 2000. p. 267.

OLIVEIRA, D.C. de; ROSELL, F.L.; SAMPAIO, J.E.C.; RODRIGUES JÚNIOR, A.L. Redução do índice de placa com Listerine: avaliação do índice de placa em relação ao uso de Listerine e/ou escovação. **RGO**, Porto Alegre, v.46, n.2, p.101-104, 107-108, abr./jun. 1998.

OMS/ORGANIZACIÓN MUNDIAL DE LA SALUD. **Pautas generales para las metodologías de investigación de la medicina tradicional**. Ginebra, 2000. Disponível em: <http://www.who.it/em>. Acesso em: 10 ago. 2004.

OMS/ORGANIZACIÓN MUNDIAL DE LA SALUD. **Pautas para a evaluación de Medicamentos Herbarios**. Ginebra, 1991. Disponível em: <http://www.who.it/em>. Acesso em: 10 ago. 2004.

OPPENHEIM, J.J.; RUSCETTI, F.W.; FALTYNEK, C.R. Cytokines. In: STITES, D.P.; STOBO, J.D.; WELLS, J.V. **Basic clinical immunology**. 8thed. Connecticut: Appleton & Lange, 1994. p.105-123.

OPPERMANN, R.V.; KUCHNBECKER, C.R. **Periodontia Ciência e Clínica**. São Paulo: Editora Artes Médicas, 2001. 458p.

PADER, M. **Oral Hygiene Products and Praticce**. New York: Marcell Dekker, 1988. p.32-36.

PANIZZA, S. **Plantas que curam: cheiro de mato**. 17ed. São Paulo: Ibrasa, 1998. 279p.

PANZERI, H.; PEDRAZZI, V.; OGASAWARA, M.S.; ITO, I.Y.; LARA, E.H.G.; GABARRA, F.R. Um dentifrício experimental contendo própolis: avaliações físicas, microbiológicas e clínicas. **Rev. ABO Nacional**. v.7, n.1, p.26-30, fev./mar. 1999.

PARHAM, P. **O sistema immune**. Porto Alegre: Artmed, 2001. 372p.

PEREIRA, A.C.; ROSA, A.G.F.; BICUDO PEREIRA, I.M.T. O processo educativo na prevenção da doença periodontal em crianças. **Rev. Bras. Saúde Esc.**, v.3, p.44-48, 1994.

PESSINI, G.L.; HOLETZ, F.B.; SANCHES, N.R.; CORTEZ, D.A.G.; DIAS FILHO, B.P.; NAKAMURA, C.V. Avaliação da atividade antibacteriana e antifúngica de extratos de plantas utilizados na medicina popular. **Rev. Bras. Farmacog.**, v.13, supl., p.21-24, 2003.

PICK, E.; KEISARI, Y. A simple colorimetric method for measurement of hydrogen peroxide by cell in culture. **J. immunol. Methods**. Amsterdam, v.38, p.61-70, 1980.

PICK, E.; MIZEL, D.J. Rapid microassays for the measurement of superoxide and hydrogen peroxide production by macrophages in culture using an automatic enzyme immunoassay reader. **J. Immunol. Methods**. Amsterdam, v.46, p. 211-226, 1981.

PIERONI, A.; QUAVE, C.L.; VILLANELLI, M.L.; MANGINO, P.; SABBATINI, G.; SANTINI, L.; BOCCETTI, T.; PROFILI, M.; CICCIOLO, T.; RAMPA, L.G.; ANTONINI, G.; GIROLAMINI, C.; CECCHI, M.; TOMASI, M. Ethnopharmacognostic survey on the natural ingredients used in folk cosmetics, cosmeceuticals and remedies for healing skin diseases in the inland Marches, Central-Eastern Italy. **J. Ethnopharmacol**. v.91, p.331-344, 2004.

PINTO T. de J.A.; KANEKO T.M.; OHARA M.T. **Controle Biológico de Qualidade de Produtos Farmacêuticos, Correlatos e Cosméticos**. 2ed. São Paulo: Atheneu, 2003. 325p.

PORTE, A.; GODOY, R.L. de O. alecrim (*Rosmarinus officinalis* L.): propriedades antimicrobiana e química do óleo essencial. **Bol. Centro Pesqui. Process. Aliment**. v.19, n.2, p.193-210, jul./dez. 2001.

PRISTA, L.N.; ALVES, A.C.; MORGADO, R. **Tecnologia Farmacêutica**. 5ed. Lisboa: Fundação Calouste Gulbenkian, 1995. v.1. 786p.

PUPPIN FILHO, A.; GOLDNER, M.T.A. Efeitos da clorexidina sobre a condição periodontal de pacientes com aparelhos fixos. In: FÓRUM DE PROJETOS DE PESQUISA, 1., 2000, Rio de Janeiro. **Resumos eletrônicos...** Rio de Janeiro: / UERJ, 2000. Disponível em: http://www.sbpqo.org.br/resumos/2000_p.html. Acesso em: 28 abr. 2003.

RAMACCIATO, J.C. **Atividade antimicrobiana de soluções à base de alho (*Allium sativum*), óleo de melaleuca (*Melaleuca alternifolia*) e clorexidina sobre microrganismos totais e estreptococos do grupo *Mutans***. Estudo *in vivo*. Dissertação (Mestrado em Odontologia), Faculdade de Odontologia de Piracicaba, Universidade Estadual de Campinas, Piracicaba, 2000.

RAIN-TREE. Presence of compounds in Pau d'Arco (*Tabebuia impetiginosa*). Disponível em: www.rain-tree.com/pau-d-arco-chemicals.pdf. Acesso em: jan. 2005.

RATES, S.M.K. Promoção do uso racional de fitoterápicos: uma abordagem no ensino de Farmacognosia. **Rev. Bras. de Farmacogn.** v.11, n.2, p.57-69, 2001.

REY, L. **Dicionário de termos técnicos de Medicina e Saúde**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1999. 825p.

RINGBOM, T.; SEGURA, L.; NOREEN, Y.; PERERA, P.; BOHLIN, L. Ursolic acid from *Plantago major*, a selective inhibitor of cyclooxygenase-2 catalyzed prostaglandin biosynthesis. **J. Nat. Prod.**, v.61, n.10, p.1212-1215, Oct. 1998.

ROWE, R.C.; SHESKEY, P.J.; WELLER, P.J. **Handbook of Pharmaceutical Excipients**. 4edth. London. Chicago: Pharmaceutical Press, 2003 .776p.

ROITT, I.; DELVES, P.T. **Roitt's essencial immunology**. 9thed. London: Blackwell Science, 1997. 476p.

ROITT, I.; BROSTOFF, J.; MALE, D. **Imunologia**. 5ed. São Paulo: Manole, 1999. 423p.

RÚBIO E. **Gengivite e periodontite**. Disponível em: <http://www.eduardorubio.odo.br>. Acesso em: 12 jan. 2004

RUBIRA, I.R.F. **Pesquisa de bactérias bucais em amostras de placa subgengival de indivíduos com periodonto normal e de portadores de periodontite através da técnica do "Slot Immunoblot"**. 1993. Tese (Doutorado em Odontologia), Faculdade de Odontologia, Universidade de São Paulo, Bauru, 1993.

SAMUELSEN, A.B. The traditional uses, chemical constituents and biological activities of *Plantago major* L. A review. **J. Ethnopharmacol.** v.71, n.1-2, p.1-21, Jul. 2000.

SCHINDLER, H.; BODGAN, C. NO as a signaling molecule: effects on kinases. **Int. J. Immunopharmacol.**, Amsterdam, v.1, p.1443-1455, 2001.

SEGURA, M.E.C. **Estudos dos compostos de inclusão tipo hospedeiro-convidado entre a beta-ciclodextrina e a clorexidina. Avaliação in vitro.** Tese (Doutorado em Odontologia), Faculdade de Odontologia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 1999.

SEREITI, M.R.; ABU AMER, K.M.; SEN, P. Pharmacology of rosemary (*Rosmarinus officinalis* Linn.) and its therapeutic potentials. **Indian J. Exp. Biol.**, v.37, n.2, p.124-130, Feb., 1999.

SILVA, I.; FRANCO, S.L.; MOLINARI, S.L.; CONEGERO, C.I.; MIRANDA NETO, M. H. de; CARDOSO, M.L.C.; SANT'ANA, D. de M.G.; IWANKO, N.S. **Noções sobre o organismo humano e utilização de plantas medicinais.** 18ed. Cascavel: Assoeste Editora Educativa, 1995. 203p.

SOARES, A.C.; PEREIRA, C.A.M.; VILEGAS, J.H.Y. **Doseamento de flavonóides em partes aéreas de espécies brasileiras de *Passiflora* (maracujá).** Disponível em: <http://www.usp.br/siicusp/8osiicusp/resumos/ficha912.htm>. Acesso em: 15 nov. 2004.

SÖKMEN, A.; ÜLNLÜ, G.V.; POLISSIOU, M.; DAFERERA, D.; SÖKMEN, M.; DÖNMEZ E. Antimicrobial activity of essential oil and methanol extracts of *Achillea sintenisii* Hub. Mor. (Asteraceae). **Phytother. Res.** v.17, p.1005-1010, 2003.

STASI, L.C.D.; LIMA, C.A.H. **Plantas medicinais na Amazônia e na Mata Atlântica.** 2ed. São Paulo: Editora UNESP, 2002. 604p.

TESKE, M.; TRENTINI, A.M.M. **Compêndio de Fitoterapia.** 4ed. Curitiba: Herbarium Laboratório Botânico, 1995. 317p.

TODESCAN, J.H. **Doença Periodontal: Conceitos e Classificações.** São Paulo: Editora Santos, 2001. 158p.

TOOTH ANATOMY QUIZ PRINTOUT. Disponível em: <http://www.enchantedlearning.com/subjects/anatomy/teeth/toothquiz.shtml>. Acesso em: 15 dez. 2004.

TORRES, C.R.G.; KUBO, C.H.; ANIDO, A.A.; RODRIGUES, J.R. Agentes antimicrobianos e seu potencial de uso na Odontologia. **Rev. Fac. Odontol.** São José dos Campos, v.3, n.2, jul./dez., 2000.

TREVIZANI, L.M.M. **Efeito do gel dentifrício formulado com extratos vegetais em doenças periodontais.** 2002. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas), Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade Estadual Paulista, Araraquara, 2002.

UNITED STATES PHARMACOPEIA, 23th. Ed. Rockcille: United States Pharmacopeial Convention, 1995. p. 1790-1791, 1801, 1838, 1949, 1981-1982.

UZEDA, M. de. **Microbiologia oral:** etiologia da cárie, doença periodontal e infecções endodônticas. Rio de Janeiro: Medsi, 2002. 104p.

VENNAT, B.; GROSS, D.; POURRAT A.; POURRAT, H. *Hamamelis virginiana*: Identification and assay of proanthocyanidins, phenolic acids and flavonoids in leaf extracts. **Pharm. Acta Helv.** v.67, n.1, p.11-14, 1992.

WAALER, S.M.; ROLLA, G.; SKJORLAND, K.K.; OGAARD, B. Effects of oral rinsing with triclosan and sodium lauryl sulfate on dental plaque formation: a pilot study. **Scand. J. Dent. Res.** v.101, n.4, p.192-195. Aug. 1993.

WILLIAMS, J.E. Review of antiviral and immunomodulating properties of plants of the peruvian rainforest with a particular emphasis on Uña de Gato and Sangre de Grado. **Altern. Med. Rev.**, Saindpoint, v.6, n.6, p.567-579, 2001.

WILLERSHAUSEN, B; GRUBER, I; HAMM, G. Índice de placa e sangramentos gengivais: a influência de ingredientes herbários. **Rev. Assoc. Paul. Cir. Dent.** v.48, n.3, p.1335-1340, maio/jun. 1994.

WILKINSON, J.B.; MOORE, R.J. Los dientes y productos dentales, In: WILKINSON, J.B.; MOORE, R. J. **Cosmetologia de Harry.** Madrid: Diaz de Santos, 1990. p.649-97.

WILSON, T.G.; KORNMAN, K.S. **Fundamentos de Periodontia.** São Paulo: Quintessence Editora, 2001. 564p.

WINTER, C.A.; RISLEY, E.A.; NUSS, G.W. Carrageenin- induced edema in hind paw of the rat as an assay for anti-inflammatory drugs. **Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine.** v.11, p.544-547, 1962.

WOISKY, R.G.; SALATINO, A. Analysis of propolis: some parameters and procedures for chemical quality control. **J. Apic. Res.** v.37, p.99-105. 1998.

XAVIER, M.N.; RAMOS, I.N.C.; XAVIER FILHO, L. **A Fitoterapia no combate às afecções bucais.** João Pessoa: Editora Idéia, 1995. 212p.

YANKELL, S.L.; EMLING, R.C.; PEREZ, B. Six-month evaluation of Parodontax dentifrice compared to a placebo dentifrice. **J. Cli. Dent.** v.4, n.1, p.26-30, 1993.

ANEXOS