

UNIVERSIDADE FEDERAL DE JUIZ DE FORA  
FACULDADE DE FARMÁCIA  
MESTRADO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

ÉRIKA MARIA HENRIQUES MONTEIRO

Desenvolvimento de solução enxaguatória bucal bifásica  
contendo extratos naturais de plantas

JUIZ DE FORA  
2012

ÉRIKA MARIA HENRIQUES MONTEIRO

Desenvolvimento de solução enxaguatória bucal bifásica  
contendo extratos naturais de plantas

Dissertação de mestrado em Ciências  
Farmacêuticas pela Faculdade de Farmácia  
da Universidade Federal de Juiz de Fora.

Orientadora: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Célia Hitomi Yamamoto

JUIZ DE FORA

2012

ÉRIKA MARIA HENRIQUES MONTEIRO

**Desenvolvimento uma solução enxaguatória bucal bifásica  
contendo extratos naturais de plantas**

Dissertação de mestrado submetida ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, da Universidade Federal de Juiz de Fora – UFJF, como parte dos requisitos necessários à obtenção do título de Mestre em Ciências Farmacêuticas.

Aprovada em 17/07/2012.

Banca Examinadora:

---

Prof<sup>ª</sup>. Dra. Célia Hitomi Yamamoto – Orientadora  
Universidade Federal de Juiz de Fora

---

Prof<sup>ª</sup>. Dra. Terezinha de Jesus Andreoli Pinto – Livre Docente  
Universidade de São Paulo

---

Prof<sup>ª</sup>. Dra. Anamaria Leite – Docente  
Universidade Federal de Juiz de Fora

A todos que de alguma forma me ajudaram a realizar este trabalho.

## **AGRADECIMENTOS**

Em primeiro tenho que agradecer a Deus.

A elaboração deste trabalho envolveu a colaboração de várias pessoas, entre elas agradeço especialmente:

A minha orientadora, professora e amiga Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup>. Célia Hitomi Yamamoto, pela oportunidade, ensinamentos, orientação e principalmente pela compreensão.

As minhas queridas amigas de laboratório e vida: Aline, Daniela, Gisele, Manuela, Sandra e Vaneida que não mediram esforços para colaborarem a realização deste.

Aos colegas de trabalho no Carrefour que compreenderam minhas ausências e me apoiaram nesta jornada dupla.

Ao Jésus, Pitanga e Rosangela que auxiliaram na coleta e identificação das amostras.

Ao professor Orlando Vieira Souza, professor José de Jesus Ribeiro Gomes de Pinho e professora a Maria da Penha Henriques do Amaral por colaborar para execução de parte experimental deste trabalho, pelo auxílio científico em muitas ocasiões e pela atenção constante.

Á todos os colaboradores, colegas e professores do Mestrado em Ciências Farmacêuticas da UFJF que fizeram parte da realização deste sonho.

A minha grande família por ser meu constante alicerce.

Este trabalho com certeza foi realizado com a ajuda de todos.

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO.....</b>	<b>15</b>
<b>2</b>	<b>REVISÃO DA LITERATURA.....</b>	<b>17</b>
2.1	A Problemática da Saúde Bucal no Brasil.....	17
2.2	Conhecimento geral envolvendo cavidade Oral.....	18
2.3	Noções sobre o microbioma oral humano.....	20
2.3.1	Microrganismos potencialmente patogênicos do microbioma oral.....	21
2.4	Importância da placa bacteriana e sua relação com as infecções bucais.....	22
2.5	Tratamentos terapêuticos das doenças periodontais.....	24
2.6	Fitoterapia empregada na prevenção da saúde bucal.....	25
2.6.1	Considerações gerais sobre fitoterapia no Brasil.....	25
2.6.2	Produtos comerciais de enxaguatórios bucais contendo bioativos.....	26
2.7	Considerações sobre espécies vegetais empregadas na preparação de enxaguatórios bucais.....	28
2.7.1	<i>Mentha arvensis</i> .....	28
2.7.2	<i>Eucalyptus globulus</i> .....	29
2.7.3	Óleo de gergelim.....	30
<b>3</b>	<b>OBJETIVO.....</b>	<b>32</b>
3.1	Objetivo Geral.....	32
3.2	Objetivos Específicos.....	32
<b>4</b>	<b>MATERIAL E MÉTODOS.....</b>	<b>33</b>
4.1	Material.....	33
4.1.1	Amostras.....	33
4.1.2	Cepas de Microrganismos Padrão empregadas na avaliação da atividade antimicrobiana.....	33
4.1.3	Animais usados para ensaio de toxicidade aguda, ação antiinflamatória e antinociceptiva.....	33
4.2	Métodos.....	34
4.2.1	Preparação dos extratos aquosos de <i>Mentha Arvensis</i> e <i>Eucalyptus globulus</i> .....	34

4.2.2	Pesquisa de classes químicas do metabolismo secundário dos extratos aquoso da <i>Mentha arvensis</i> e <i>Eucalyptus globulus</i> .....	34
4.2.3	Determinação da atividade antimicrobiana em meio de cultura sólido por técnica de difusão em Agar, segundo técnica adaptada da Farmacopéia Brasileira 5ª ed., 2010.....	35
4.2.4	Avaliação da concentração inibitória mínima do extrato aquoso de <i>M. arvensis</i> , <i>E. globulus</i> e do óleo de gergelim frente à <i>S. mutans</i> ATCC 25175, método adaptado de diluição em meio de cultura líquido ( <i>Kirb-Bauer</i> ).....	36
4.2.5	Determinação da concentração Inibitória Mínima de Aderência (CIMA) do <i>Streptococcus mutans</i> ATCC 25175 a uma superfície.....	37
4.2.6	Determinação da atividade antiinflamatória e antinociceptiva do óleo de gergelim.....	37
4.2.6.1	Avaliação da toxidez aguda para o óleo de gergelim.....	37
4.2.6.2	Teste de Contorções Abdominais para o óleo de gergelim.....	38
4.2.6.3	Teste da Formalina para o óleo de gergelim.....	38
4.2.6.4	Teste da Placa Quente para o óleo de gergelim.....	38
4.2.6.5	Edema de Pata Induzido Por Carragenina para o óleo de gergelim.....	39
4.2.6.6	Pleurisia Induzida Por Carragenina para o óleo de gergelim.....	39
4.2.7	Identificação dos compostos principais do Óleo de Gergelim por Cromatografia Gasosa acoplada em espectrometria de Massa – CG/EM.....	40
4.3	Análise estatística dos Dados.....	40
<b>5</b>	<b>RESULTADOS</b> .....	<b>41</b>
5.1	Pesquisa das classes químicas do metabolismo secundário dos extratos aquoso da <i>Mentha arvensis</i> e <i>Eucalyptus globulus</i> .....	41
5.2	Determinação da atividade antimicrobiana em meio de cultura sólido por técnica de difusão em ágar, segundo técnica adaptada da Farmacopéia Brasileira 5ª ed., 2010.....	43
5.3	Avaliação concentração mínima inibitória (CIM) do extrato aquoso de <i>Mentha arvensis</i> , <i>Eucalyptus globulus</i> e do óleo de gergelim frente à	

	<i>Streptococcus mutans</i> ATCC 25175 pelo método de diluição em meio de cultura líquido (Kirb-Bauer).....	46
5.4	Determinação da concentração Inibitória Mínima de Aderência (CIMA) do <i>Streptococcus mutans</i> ATCC 25175 a uma superfície.....	49
5.5	Avaliação da toxidez aguda do óleo de gergelim.....	53
5.6	Teste De Contorções Abdominais para o óleo de gergelim.....	53
5.7	Teste Da Formalina para o óleo de gergelim.....	54
5.8	Teste Da Placa Quente para o óleo de gergelim.....	55
5.9	Edema De Pata Induzido Por Carragenina para o óleo de gergelim	56
5.10	Pleurisia Induzida Por Carragenina para o óleo de gergelim.....	56
5.11	Identificação dos compostos principais do Óleo de Gergelim por Cromatografia Gasosa acoplada em espectrometria de Massa – CG/EM.....	58
5.12	Desenvolvimento do exagatório bucal bifásico contendo extrato aquoso de <i>E. globulus</i> e óleo de gergelim .....	60
<b>6</b>	<b>CONCLUSAO</b> .....	<b>61</b>
<b>7</b>	<b>SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS</b> .....	<b>62</b>
	<b>REFERÊNCIAS</b> .....	<b>63</b>

## RESUMO

A abrangência da utilização de fitoterápicos e de plantas medicinais é vasta e engloba fins variados, também em relação à saúde bucal. 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. Com a finalidade de auxiliar os métodos convencionais de higiene bucal, muitos agentes químicos vêm sendo estudados, entre produtos com ação antimicrobiana e antiinflamatória. O presente trabalho teve o objetivo de propor o desenvolvimento um enxaguatório bucal bifásico contendo extratos naturais. Fez-se o *screening* fotoquímico dos extratos aquosos de *Eucalyptus globulus*, *Mentha arvensis* e a identificação por CG/EM dos compostos principais do óleo de gergelim. Realizou-se experimentos para testar a ação antimicrobiana dos extratos aquosos de *Eucalyptus globulus*, *Mentha arvensis* e o óleo de gergelim (teste de difusão em agar, concentração mínima inibitória (CIM) e concentração mínima de aderência (CIMA) frente a cepa padrão *Streptococcus mutans* ATCC 25175. Realizou-se também ensaios para avaliar a ação antiinflamatória e antinociceptiva do óleo de gergelim. Nos extratos aquosos de *M. arvensis* não foram encontrados taninos, flavonóides e saponinas, também não apresentaram atividade sobre a bactéria testada. O extrato aquoso de *E. globulus* foi positivo para a presença de taninos, flavonóides e saponinas. Também apresentou atividade sobre *Streptococcus mutans* ATCC 25175 observando um halo de  $20,0 \pm 0,66$  cm ( $p < 0,05$ ), a CIM e a CIMA foi determinada com a E4 (12,5 mg/mL), o óleo de gergelim não apresentou halo no teste de difusão em Agar, acredita-se que seja pelo fator de difusão do óleo, pois em meio líquido apresentou atividade, a CIM e CIMA foi a OG 3 (25%). O óleo de gergelim apresentou atividade antiinflamatória e antinociceptiva nos ensaios realizados e no CG/EM deste óleo mostrou a presença de ácido graxos insaturados que já possuem atividades antiinflamatórias comprovadas. Conclui-se que os extratos aquosos de *E. globulus* e o óleo de gergelim possuem potencial para serem empregados como prováveis enxaguatórios bucais.

Palavras chaves: *Streptococcus mutans*, óleo de gergelim, *Eucalyptus globulus*, enxaguatório bucal

## ABSTRACT

The extent of use of herbal and medicinal plants is vast and encompasses varied purposes, also in relation to oral health. The control of the biofilm within the various specialties dental is of great importance because it points for both the prevention and for the treatment of dental caries and periodontal disease. In order to assist the conventional oral hygiene methods, many chemical agents have been studied, among products with antimicrobial and anti-inflammatory action. This study aimed to develop a proposed two-phase mouthwash containing natural extracts. There was photochemical screening of aqueous extracts of *Eucalyptus globulus*, *Mentha arvensis*, identifying by GC / MS of the main compounds of sesame oil. We conducted experiments to test the antimicrobial activity of aqueous extracts of *Eucalyptus globulus*, *Mentha arvensis* and sesame oil (agar diffusion test, minimum inhibitory concentration (MIC) and minimum concentration of adhesion (MICA) compared to standard strain *Streptococcus mutans* ATCC 25175. Also conducted tests to evaluate the antinociceptive and anti-inflammatory action of sesame oil. The aqueous extract of *M. arvensis* were not found tannins, flavonoids and saponins, this also did not show activity against the bacteria tested. The aqueous extract of *E. globulus* was positive for the presence of tannins, flavonoids and saponins. Also showed activity against *Streptococcus mutans* ATCC 25175 observed a halo of  $20.0 \pm 0.66$  cm ( $p < 0.05$ ), MIC and MICA was determined with the E4 (12.5 mg/ml), the oil sesame not present in the test halo Agar diffusion is believed to be by a factor of oil dilution, as in liquid medium was active, the MICA and MIC was OG 3 (25%). Sesame oil presented antinociceptive and antiinflammatory tests and GC / MS of this oil showed the presence of unsaturated fatty acid that already have proven anti-inflammatory activities. It is concluded that the aqueous extract of *E. globulus* and sesame oil are potentially likely to be employed as mouthwashes.

Keywords *Streptococcus mutans*, sesame oil, *Eucalyptus globulus*, mouthwash

## LISTA DE FIGURA

Figura 1	<i>M. arvensis</i> cultivada no horto da Faculdade de Farmácia na UFJF..	28
Figura 2	Árvore de <i>Eucalyptus globulus</i> cultivada próximo ao prédio da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal de Juiz de fora.....	29
Figura 3	Resultado do teste de difusão para o extrato aquoso de <i>M. arvensis</i> . Observando os extratos M1(100 mg/mL), M2(50 mg/mL), M3 (25 mg/mL) e M4 (12,5 mg/mL) no sentido horário da figura.....	44
Figura 4	Resultado do teste de difusão para o óleo de gergelim, sustância padrão de clorexidina (1,2 mg/mL), amostra comercial de clorexidina (1,2 mg/mL) e água como controle positivo (amostras no sentido horário).....	45
Figura 5	Resultado do teste de difusão para as diluições do extrato aquoso de <i>E.globulus</i> . Os halos dos extratos E1 (100mg/mL), E2 (50mg/mL), E3 (25mg/mL) e E4 (12,5 mg/mL) são indicados no sentido horário da figura.....	45
Figura 6	Determinação da CIM dos extratos aquoso diluídos de <i>E. globulus</i> , as diluições seguem da esquerda para direita: E1(100 mg/mL) , E2 (50 mg/mL) ,E3 (25 mg/mL), E4 (12,5 mg/mL) e E5 (6,25 mg/mL). Devido o extrato aquoso ser turvo a solução já apresentava turvação.....	47
Figura 7	Determinação da CIM para atividade antimibriana dos extratos aquosos diluídos de <i>E. globulus</i> , pelo repique realizado no primeiro ensaio, as diluições seguem da esquerda para direita E1(100 mg/mL) , E2 (50 mg/mL) ,E3 (25 mg/mL), E4 (12,5 mg/mL) e E5 (6,25 mg/mL).....	48
Figura 8	Determinação da CIM do óleo de gergelim. As diluições seguem da esquerda para direita: OG1 (100%), OG2 (50%), OG3 (25%), OG4 (12,5%) e OG5 (6,25%). A partir da OG 4 ocorreu turvação.....	49
Figura 9	Controle positivo (C+) e negativo (C-) com água destilada do teste de CIMA para o <i>Streptococcus mutans</i> ATCC 25175. Sendo que o	

	C+ observa-se a aderência da massa bacteriana ao vidro e o C- não é observado.....	50
Figura 10	Teste de CIMA para os extratos aquosos M1 e M 2 da <i>M. arvensis</i> . Apresenta aderência ao vidro.....	50
Figura 11	Teste de CIMA para os extratos aquosos de <i>E. globulus</i> . Diluições E1, E2, E3, E4 e E5 da esquerda para direita. A diluição E5 apresenta aderência ao vidro.....	51
Figura 12	Teste de CIMA para a diluição OG3 observa-se que não ocorreu aderência ao tubo.....	51
Figura 13	Teste de CIMA para a diluição OG4 observa-se que ocorreu aderência ao tubo.....	51
Figura 14	Cromatograma do óleo de gergelim amostra comercial.....	59
Figura 15	Enxaguatório bucal bifásico proposto com 20 % de óleo de gergelim comercial e 80 % do extrato aguoso de <i>E.globulus</i> 100 mg/mL.....	60

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Ensaio fitoquímico realizado de avaliação com dos extratos aquosos de <i>Mentha arvensis</i> e <i>Eucalyptus globulus</i> para determinar a presença ou ausência dos metabólitos secundários flavonóides, taninos e saponinas.....	41
Tabela 2	Valores do tamanho dos halos de inibição de crescimento (mm) referente ao do extrato de <i>E. Globulus</i> (E1, E2, E3), clorexidina – substância padrão (1,2 mg/mL), clorexidina- amostra comercial (1,2 mg/mL) em meio de cultura sólido por técnica de difusão em Agar frente à cepa padrão de <i>Streptococcus mutans</i> ATCC 5175).....	46
Tabela 3	Resultado da CIM para a clorexidina- substância padrão, <i>E. globulus</i> e Óleo de gergelim amostra comercial .....	48
Tabela 4	Resultado da CIMA para a clorexidina- substância padrão, <i>E. globulus</i> e Óleo de gergelim amostra comercial.....	50
Tabela 5	Efeito do óleo de gergelim na inibição das contorções abdominais induzidas por ácido acetico em camundongos.....	53
Tabela 6	Efeitos do óleo de gergelim a partir nocicepção induzida por formalina em camundongos.....	54
Tabela 7	Efeitos do óleo de gergelim sobre o tempo de latência de ratos expostos ao teste da placa quente.....	55
Tabela 8	Efeitos do óleo de gergelim sobre o edema de pata de rato induzido por carragenina.....	56
Tabela 9	Efeitos do óleo de gergelim na exsudação pleural e no número de leucócitos no pleurisia induzida por carragenina em ratos.....	57
Tabela 10	Principais componentes do óleo de gergelim em tempo de retenção na coluna HP-5 e concentração (%) dos constituintes.....	60

## LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

%	Percentual
ANOVA	Análise de Variância
ATCC	American Type Culture Collection
C+	Controle positivo
C-	Controle negativo
CESJ	Herbário Leopoldo Krieger
CIM	Concentração Mínima Inibitória
°C	Graus Celsius
CIMA	Concentração Mínima Inibitória de Aderência
CG/EM	Cromatografia gasosa acoplada ao espectro de massa
DL 50	Dose Letal Mediana
E1	Extrato Aquoso Inicial de <i>Eucalyptus globulus</i>
E2	Extrato Aquoso Diluído 1:2 do Extrato E1
E3	Extrato Aquoso Diluído 1:2 do Extrato E2
E4	Extrato Aquoso Diluído 1:2 do Extrato E3
E5	Extrato Aquoso Diluído 1:2 do Extrato E4
E.P.M	Erro Padrão da Média
FIOCRUZ	Fundação Oswaldo Cruz
G	Gramas
g/kg	Gramas por quilograma
M1	Extrato Aquoso Inicial de <i>Mentha arvensis</i>
M2	Extrato Aquoso Diluído 1:2 do Extrato M1
M3	Extrato Aquoso Diluído 1:2 do Extrato M2
M4	Extrato Aquoso Diluído 1:2 do Extrato M3
M5	Extrato Aquoso Diluído 1:2 do Extrato M4
mL	Mililitros
mm <sup>3</sup>	Milímetros ao cubo
mg/kg	Miligrama por quilograma
nº	Número
OG1	Óleo de Gergelim Amostra Comercial
OG2	Óleo de Gergelim Diluído 1:2 do OG1

OG3	Óleo de Gergelim Diluído 1:2 do OG2
pH	Potencial de Hidrogênio Iônico
p/v	Peso por volume
RDC	Resolução de Diretoria Colegiada
RE	Resolução Específica
s.c.	Via Subcutânea
SUS	Sistema Único de Saúde
µm	Microgramas
µL	Microlitros
UFC	Unidade Formadora de Colônias
UFJF	Universidade Federal de Juiz de Fora
v.o.	Via Oral
v/v	Volume por volume

## 1 INTRODUÇÃO

As plantas medicinais constituem importante recurso terapêutico para a promoção da saúde. A abrangência da utilização de fitoterápicos é vasta e engloba fins variados, como exemplo, produtos para auxiliar a tratar e manter a saúde bucal. A eficácia de extratos de plantas empregadas em enxaguatórios bucais, tem sido investigada para o tratamento de gengivites e redução do biofilme bacteriano. Os resultados indicam sua utilização como apoio à terapia das doenças periodontais e como profilaxia de rotina (LEITES, 2006).

A situação epidemiológica da saúde bucal brasileira é grave devido às condições sociais e econômicas da população. Embora a Odontologia se mostre muito desenvolvida tecnologicamente, esta não responde em níveis significativos às necessidades da população. Os programas de Saúde Bucal subsidiados pelo Sistema Único de Saúde têm trabalhado a questão educativa junto à população, provendo informações necessárias ao desenvolvimento de hábitos para manter a saúde e prevenir as doenças bucais (UNFER e SALIBA, 2000).

Dentre os principais problemas bucais a serem prevenidos está a presença da placa bacteriana dental. Esta consiste de uma massa densa, não calcificada, formada por microrganismos envolvidos numa matriz rica em polissacarídeos extracelulares bacterianos e glicoproteínas salivares, firmemente aderida aos dentes e outras superfícies da cavidade bucal. Na maioria das vezes a placa se desenvolve sobre a película adquirida, que é um biofilme derivado da saliva que reveste toda a cavidade bucal (LEITES, 2006).

O controle do biofilme bacteriano dentro das diversas especialidades odontológicas é de grande importância. Muitos agentes químicos vêm sendo estudados com a finalidade de auxiliar os métodos convencionais de higiene bucal (escovação e fio ou fita dental), compostos quaternários de amônio, acetato e gluconato de clorexidina (BUGNO *et al.*, 2006).

Com as limitações dos métodos mecânicos de higiene, os agentes antimicrobianos como forma de enxaguatórios bucais são amplamente utilizados no controle dessa placa, auxiliando os métodos mecânicos de remoção e diminuindo o número de microrganismos patogênicos na cavidade oral (BUGNO *et al.*, 2006).

Atualmente, a clorexidina é o anti-séptico mais utilizado no controle do biofilme bacteriano. No entanto, seu uso freqüente e por longo prazo, apresenta

muitos efeitos colaterais dentre estes: a perda da sensibilidade do paladar, o sabor amargo, provocar manchas nos dentes embora de forma reversível e podendo ainda causar resistência bacteriana (FARIAS, 2003; TAMBELINI *et al.*, 2010).

Em busca de novos produtos para este fim, os fitoterápicos constituem alternativa viável economicamente, contribuindo para melhorar o acesso da população aos cuidados com a prevenção e tratamento de doenças periodontais.

Frente ao exposto, o propósito do presente estudo foi desenvolver um enxaguatório bucal bifásico utilizando os extratos aquosos das folhas de *Mentha arvensis*, *Eucalyptus globulus* e óleo de gergelim através de análise de suas atividades antimicrobiana, antiinflamatória e antinociceptiva.

## **2 REVISÃO DA LITERATURA**

### **2.1 A Problemática da Saúde Bucal no Brasil**

Até a década de 1970, a maioria das ações no campo da saúde bucal era descontínua e esporádica, existia falta de políticas governamentais. Essas ações apresentavam basicamente características de campanha, não sendo propriamente programa em benefício da população. Em instituições de saúde mais bem estruturadas, procurava-se adotar como base um único método de prevenção, por exemplo: a fluoretação das águas de abastecimento público ou a realização de bochechos fluorados semanais (PORTO, 2002).

No final da década de 1980, foi instituída pela Constituição Brasileira, o Sistema Único Saúde (SUS), estabelecendo os princípios que iriam definir o seu modelo de assistência à saúde: universalidade, descentralização e equidade, respaldadas pelo apoio e controle popular. Foi estabelecido que a saúde deve ser garantida por políticas sociais e econômicas que reduzam o risco de doenças e outros agravos. Devendo o atendimento ser integral, priorizando as atividades preventivas, sem haver prejuízo dos serviços assistenciais; dentre estes programas assistenciais foi desenvolvida a Política Nacional de Saúde Bucal (ALVES, 2003).

As prioridades dessa política foram definidas segundo os grupos populacionais. Tinham como objetivo desenvolver novas tecnologias e ações coletivas para a saúde bucal, tendendo a alterar suas características epidemiológicas e obter impacto na cobertura da população. Para atingir essas metas, foi imprescindível criar e incentivar práticas comunitárias que possibilitassem o crescimento da consciência sanitária e a mobilização da sociedade civil em torno desta questão. Apesar das conquistas do movimento sanitário brasileiro ter sido consolidadas parcialmente na atual Constituição, na prática, essas conquistas não se concretizaram em melhoria da qualidade de vida da população brasileira, tendo deficiência na inserção do profissional cirurgião dentista nas equipes do Programa de Saúde da Família e em hospitais (PORTO, 2002).

No Brasil, um dos desafios das últimas décadas, foi o desenvolvimento de produção, distribuição e consumo maciço de bens e serviços relativos à saúde bucal (MAGAZZINI *et al.*, 2004).

Analisando as propostas e as ações relativas à prática odontológica no Brasil no período de 1952-1992, observa-se que estas se caracterizavam por uma odontologia de mercado, apoiada na assistência Odontológica individual, realizada no restrito ambiente clínico cirúrgico. Essa concepção exerceu forte influência no desenvolvimento da ciência e da tecnologia em saúde bucal, mas não responde de modo significativo, aos problemas de saúde bucal da população, por se tratar de uma prática de custo alto e baixa cobertura, com enfoque fundamentalmente, curativo (TAMBELINI *et al.*, 2010).

No Brasil, a cárie e as doenças periodontais ainda atingem índices muito superiores aos recomendados pela Organização Mundial de Saúde. Mesmo com avanços em todas as áreas da saúde e isto inclui melhoria da saúde bucal, a prevalência de cáries dentais em países europeus chegam a atingir de 60 a 90% de crianças com idade escolar (KARTHIKEYAN *et al.*, 2011).

Observa-se que a falta de acesso a uma saúde bucal com qualidade pode levar a perda dos dentes levando à dificuldade de mastigação dos alimentos, vergonha de sorrir e se comunicar, afetando a qualidade de vida das pessoas. No Brasil, aproximadamente 14,4% dos adolescentes perderam pelo menos um de seus dentes, e 13,5% deles nunca realizaram uma consulta com o cirurgião-dentista (TAMBELINI *et al.*, 2010).

## **2.2 Conhecimento geral envolvendo cavidade oral**

A cavidade oral é uma das portas de entrada ao organismo humano, pertencendo ao sistema digestório, também funciona como uma via de acesso às vias respiratórias (WILSON e KORNMAN, 2001).

A cavidade oral é dividida em duas partes: o vestíbulo da boca e a cavidade própria da boca. O vestíbulo da boca é o espaço semelhante a uma fenda entre os dentes e a gengiva e os lábios e as bochechas. A cavidade própria da boca é o espaço entre os arcos dentais superiores e inferiores. Estando a boca fechada e em repouso, a cavidade da boca é completamente ocupada pela língua. As regiões da cavidade oral podem ser separadas por: gengivodentária, palatina, geniana, lingual. A gengiva é formada por tecido fibroso coberto por mucosa (WILSON e KORNMAN, 2001).

Uma gengiva saudável é resistente ao toque, não ocorrendo sangramento. Os dentes podem ser decíduos ou permanentes. Ambas as dentições diferenciam-se pela anatomia dental e pelo número de dentes apresentados. A dentição decídua possui coloração mais clara e as raízes divergentes são menores do que a permanente. A dentição permanente apresenta raízes convergentes, sendo os dentes maiores e mais escuros do que na decídua. A língua é o órgão muscular relacionado ao sentido do paladar. Fica localizada na parte ventral da cavidade oral propriamente dita, participa na fonação, sendo o único músculo voluntário do corpo humano que não sofre fadiga. O palato é o assoalho da cavidade nasal e teto da cavidade oral (WILSON e KORNMAN, 2001).

A saliva é o fluido produzido pelas glândulas salivares, possuindo como constituintes básicos a água (99,5%) e matéria orgânica (0,25%), estando representada em sua maior parte pelas proteínas. Quando a saliva é secretada na cavidade bucal, é enriquecida com células descamadas, leucócitos, anticorpos, microrganismos, restos de alimentos, fluidos do sulco gengival, muco da cavidade nasal e da faringe (GARCIA *et al.*, 2009).

A manutenção da saúde bucal e o funcionamento adequado do processo digestivo dependem da presença da saliva. A salivação auxilia a trituração dos alimentos e formação do bolo alimentar facilitando o seu transporte. Produz a amilase salivar, enzima que atua na digestão do amido, bem como ajuda na deglutição. Além disso, a saliva é responsável pela lubrificação das superfícies intra-orais, como dentes, palato, bochecha e língua, além de proteger o epitélio intestinal (GARCIA *et al.*, 2009).

A redução do fluxo salivar está relacionada com mudanças que vão desde a dificuldade de mastigação, uso de certos medicamentos, patologias sistêmicas até o aparecimento de infecções oportunistas. Um dos fatores determinantes da doença cárie é a saliva, a qual participa diretamente no processo de des-remineralização da estrutura dentária, devido à sua supersaturação aos íons cálcio e fosfato em relação ao esmalte dental (MOURA *et al.*, 2008) . A saliva também apresenta outras funções importantes na prevenção da cárie como o tamponamento dos ácidos produzidos pelos microrganismos cariogênicos do biofilme oral e propriedades antimicrobianas (MOURA *et al.*, 2008).

## 2.3 Noções sobre o microbioma oral humano

As membranas mucosas dos animais são normalmente colonizadas por um microbioma diverso, cujas espécies se inter-relacionam constantemente e também com o hospedeiro, competindo pela sua sobrevivência. As bactérias colonizam todas as superfícies de um animal, estando particularmente concentradas na cavidade bucal e no trato gastrointestinal inferior. A cavidade bucal humana hospeda mais de 400 espécies de bactérias, que já foram isoladas e identificadas. A quantidade de bactérias é de cerca de 10<sup>11</sup> células em 1 grama de biofilme dental. Fazem parte do microbioma oral microrganismos anaeróbicos, aeróbicos, facultativos e microaerófilos (DEWHIRST *et al.*, 2010).

As bactérias que colonizam inicialmente a superfície do dente são predominantemente microrganismos facultativos Gram-positivos, tais como *Actinomyces viscosus* e *Streptococcus sanguis*. Estes se aderem à película através de adesinas, que interagem com receptores específicos na película dental. (DEWHIRST *et al.*, 2010).

Na sucessão ecológica da placa bacteriana ocorre uma transição do meio ambiente aeróbico, inicialmente caracterizado por espécies Gram-positivas facultativas, para um meio altamente privado de oxigênio, com a predominância de microrganismos Gram-negativos anaeróbicos, que geralmente são mais patogênicos e resistentes. Na colonização secundária, as diferentes espécies de microrganismos (*Prevotella intermedia*, *Prevotella loescheii*, espécies de *Capnocytophaga*, *Fusobacterium nucleatum*, *Porphyromonas gingivalis*), aderem às bactérias pré-existentes na placa bacteriana. Os fatores de virulência da placa bacteriana dependem da presença ou aumento de microrganismos específicos, que produzem substâncias que provocam a destruição dos tecidos do hospedeiro (RUBIRA, *et al.*, 1996).

Sabe-se que as doenças que acometem a cavidade bucal são de origem infecciosa e potencialmente transmissíveis. Fatores como a dieta e higiene bucal definem o tipo de microbioma oral de cada indivíduo (LUYO *et al.*, 2009).

Manter uma adequada higiene oral e fazer uso comedido da sacarose podem ser responsáveis por caracterizar um microbioma com menor patogenicidade. Todavia, quando a remoção da placa bacteriana é deficiente e a utilização da

sacarose é freqüente, o processo de seleção para certos microrganismos patogênicos, torna-os mais freqüentes (AL-AHMAD *et al.*, 2010).

### 2.3.1 Microrganismos potencialmente patogênicos do microbioma oral

Vários são os microrganismos do microbioma oral potencialmente patogênicos, alguns de grande importância em causar infecções bucais. A *Candida albicans* é facilmente isolada em vários sítios da cavidade oral, dentre os quais, a língua, mucosa bucal, biofilme dental e lesão cariosa. (PAI *et al.*, 2010); *Enterococcus faecalis* são bactérias cocos Gram-positivos, habitantes comuns do trato gastrointestinal e genitourinário, podem estar associadas às lesões cariosas. Porém sua importância está na ocorrência de infecções secundárias das lesões de dentes obturados, em que a terapia antimicrobiana apresentou falhas (AL-AHMAD *et al.*, 2010; ZHU *et al.*, 2010).

Um grupo de bactérias de suma importância na gênese cariosa é o *Streptococcus*, que é constituído por sete espécies principais: *Streptococcus cricetus*, *S. downei*, *S. ferus*, *S. macacae*, *S. mutans*, *S. rattus* e *S. sobrinus*. O *S. mutans* foi associado em vários estudos, como o principal fator de influência na lesão cariosa (AWADALLA *et al.*, 2011).

O *S. mutans* possui a capacidade de metabolização da sacarose em polissacarídeos intra e extracelulares, estando este microrganismo relacionado com a aderência nos dentes e conseqüente formação do biofilme. É acidogênico, acidúrico e produz mutacinas, proteínas capazes de inibir o crescimento de outras bactérias. É encontrado de modo localizado na dentição, e sua quantidade na saliva está relacionada ao número de superfícies colonizadas. Desta forma, a alta concentração *S. mutans* na saliva pode ser indicativo de que a maioria dos dentes está colonizada por essas bactérias, aumentando o risco de cárie (KLEIN, 2003).

Vários estudos têm envolvido pesquisa no sentido de reduzir a incidência de o *S. mutans* do microbioma oral. O uso de antibióticos tais como penicilinas e tetraciclina eritromicina entre outros foram documentados. Outros agentes como clorexidina, fluoretos, álcool ou produtos contendo estes agentes são amplamente utilizados com esta finalidade. Entretanto o uso demasiado dessas substâncias químicas pode estar relacionado a efeitos colaterais como vômitos, diarreias, manchas nos dentes e aparecimento de bactérias resistentes (PALOMBO, 2009).

## **2.4 Importância da placa bacteriana e sua relação com as infecções bucais**

As lesões que afetam os tecidos que suportam os dentes têm sido descritas há cerca de 4000 anos. As manifestações dos autores na literatura ocorreram de acordo com as diferentes épocas de publicações dos trabalhos (MOIMAS, 1994).

Os primeiros conceitos de doença periodontal derivaram de observações histopatológicas e, com a evolução desta área, novos conhecimentos surgiram. Os trabalhos científicos publicados em periodontia podem ser divididos em duas épocas: antes e depois do conceito de biofilme dental como fator etiológico extrínseco da doença periodontal. Assim, após a definição de biofilme, o termo gengivite foi relacionado à inflamação do tecido gengival (OLIVEIRA, 2007).

Conhecida como uma importante doença periodontal, a placa bacteriana é uma massa densa, não calcificada, constituída por microrganismos envolvidos numa matriz rica em polissacarídeos extracelulares bacterianos e glicoproteínas salivares, firmemente aderida aos dentes, cálculos e outras superfícies da cavidade bucal. Na maioria das vezes a placa se desenvolve sobre a película adquirida, constituindo um biofilme derivado da saliva que reveste toda a cavidade bucal (LEITE, 2006).

O biofilme dental é definido como enduto formado principalmente por restos de alimentos, secreções mucosas, células epiteliais descamadas e outros materiais orgânicos além de alguns sais minerais, que ficam aderidos à superfície dos dentes e se depositam nos espaços inter dentários. Estes servem como meio de cultura para abundante proliferação de bactérias (cujo volume atinge a 75% do biofilme). Como exemplo, *Streptococcus mutans*, que se desenvolve muito na presença de sacarose e outros carboidratos residuais da alimentação (REY, 1999).

As bactérias presentes na mucosa produzem polímeros extracelulares, a partir dos carboidratos, que contribuem para a adesão do biofilme e constituem substrato nutritivo para o crescimento microbiano na ausência do açúcar (REY, 1999).

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 infecções bucais (UZEDA, 2002).

A participação microbiana na doença periodontal tem sido amplamente estudada, havendo atualmente um consenso 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 (STAMFORD *et al.*, 2002).

Segundo Uzeda (2002), as doenças periodontais são caracterizadas como um processo inflamatório dos tecidos que envolvem e sustentam o dente originando-se, em geral, de uma extensão de infecção bacteriana gengival relacionada com biofilmes dentais ou cálculos (tártaros).

O mesmo autor define gengivite como uma inflamação da gengiva, que afeta os tecidos moles em volta do dente, sem se estender ao cimento, ligamento periodontal ou osso alveolar. Por outro lado, descreve a periodontite como um processo inflamatório que afeta a gengiva, o osso alveolar e as estruturas periodontais. As características clínicas principais são sangramento da margem gengival ao escovar os dentes ou espontaneamente, vermelhidão, edema e mudança de textura (flacidez) da gengiva. A gengivite causa desconforto, sangramento e mau hálito. Se a gengivite persistir por longos períodos, meses ou anos, poderá evoluir para uma periodontite que tem como principal dano a perda de suporte dos dentes, podendo evoluir até a perda dos dentes. Para evitar a gengivite preconiza-se a correta escovação dos dentes e gengivas e uso do fio dental ou escovas interdentais pelo menos uma vez ao dia.

A periodontite é uma doença que leva a perda gradual dos tecidos de suporte do dente: osso, ligamento periodontal e cimento. A causa principal assim como na gengivite é o acúmulo de placa entre a gengiva e o dente. Porém a diferença está na resposta imunológica (defesa) que varia de indivíduo para indivíduo. As pessoas que tem uma alteração nas defesas orgânicas para menor, herdadas geneticamente ou por algum comprometimento de saúde ou comportamental, são mais suscetíveis à periodontite. A enfermidade ocorre mais freqüentemente em indivíduos adultos acima de 35 anos. Pode também, com menor freqüência, atingir pessoas jovens ou até mesmo crianças. Alterações sistêmicas como a diabetes podem influir na marcha de progressão da doença. Fumo e estresse são também coadjuvantes que contribuem para uma maior perda de sustentação em periodontites ativas (VAN, 2008).

A cárie é um processo dinâmico que ocorre nos depósitos bacterianos (placa bacteriana na superfície dos dentes), resultando em uma alteração do equilíbrio entre a superfície dentária e o fluido da placa que, com o passar do tempo, leva à

perda mineral. Caso não seja tratada adequadamente pode ocorrer a perda definitiva do dente afetado. A cárie dentária e a doença periodontal são os males que mais acometem a cavidade bucal, sendo a cárie o mais comum em crianças (THYLSTRUP e FEJERKOV, 1994).

## **2. 5 Tratamentos terapêuticos das doenças periodontais**

A correta higiene bucal, uma dieta com menor concentração de carboidratos, secreção salivar constante e profilaxias com profissionais da área odontológica contribuem para prevenção de infecções bucais (BRETAS *et al.*, 2000).

A escovação dos dentes é considerada efetiva para a remoção do biofilme em superfícies vestibulares e linguais. No entanto, existe dificuldade de se alcançar o biofilme interdental. Para superar esta dificuldade, foram criados outros dispositivos de higiene bucal, incluindo recurso de utilização do fio ou a fita dental, escova interdental e de produtos contendo ativos específicos. Muitos agentes antimicrobianos disponíveis no mercado são destinados a prevenir afecções bucais, sendo de responsabilidade do profissional da área odontológica, realizar uma correta avaliação clínica e definir o produto adequado, de acordo com o quadro apresentado pelo paciente (BUGNO *et al.*, 2006).

Os produtos para higiene bucal podem ser fabricados com diferentes veículos com finalidade de liberação dos agentes antimicrobianos na cavidade bucal. Os mais comumente utilizados são os enxagüatórios; dentifrícios, géis, gomas de mascar e pastilhas (XAVIER *et al.*, 1995).

Para a efetividade da ação antiplaca, o enxaguatório bucal deve apresentar como características essenciais, a redução da adesividade das bactérias à superfície dental, inibição do crescimento e proliferação dos microrganismos, inibição da formação da matriz intercelular da placa, modificação da bioquímica bacteriana para redução da formação de substâncias citotóxicas e modificação da ecologia do biofilme para desenvolvimento de um microbioma menos patogênico (CURY, 2000).

Dentre os produtos enxagüatórios bucais, soluções à base de clorexidina, triclosan, cloreto de cetilpiridínio ou combinações destas 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 (CURY, 2000).

Em levantamento realizado por Cury (2000), foi observado que o produto contendo o gluconato de clorexidina apresenta prescrição mais freqüente, em solução a 0,12 %, indicado para bochecho 2 vezes ao dia. Estudos demonstram que a redução pode ser de 85% a 95%, considerando as bactérias da saliva. Mas, seu gosto é amargo e a possibilidade (reversível) de manchar os dentes e mucosas têm limitado seu emprego (FARIAS, 2003).

Para o desenvolvimento de enxaguatório devem ser considerados importantes fatores relacionados à farmacotécnica do produto, como o pH e o veículo. O pH do enxaguatório bucal influi no metabolismo da placa dentária humana. O pH ácido se mostra mais efetivo na redução da fermentação e produção de polissacarídeos extracelulares pelos microrganismos. Em relação à dissolução do esmalte do dente o seu início ocorre quando o pH na superfície dentária atinge valores abaixo de 5,5 (ANSEL, 2000; PRISTA *et al.*, 2003).

O álcool é utilizado nos enxaguatórios como solvente para as substâncias adjuvantes e como conservante do produto. No entanto, foi demonstrado que o alto teor de álcool produz lesões hiperqueratinizadas tanto em homens quanto em animais de laboratório (CURY, 2000).

## **2. 6 Fitoterapia empregada na prevenção da saúde bucal**

### **2.6.1 Considerações gerais sobre fitoterapia no Brasil**

Fitoterápico, de acordo com a legislação sanitária brasileira, é o medicamento produzido com matérias-primas ativas vegetais. É caracterizado pelo conhecimento da eficácia e dos riscos de seu uso, assim como pela reprodutibilidade e constância de sua qualidade (BRASIL, 2004a).

No Brasil estão localizadas cerca de 20% das 250 mil espécies medicinais catalogadas pela UNESCO, possibilitando o aproveitamento do potencial curativo dos vegetais para o tratamento de doenças, inclusive na área de Odontologia (LORENZI e MATOS, 2002).

O principal órgão responsável pela regulamentação do uso de plantas medicinais e seus derivados no Brasil é a Agência Nacional de Vigilância Sanitária

(ANVISA), autarquia do Ministério da Saúde. Essa tem como papel proteger e promover a saúde da população garantindo a segurança sanitária de produtos e serviços e participando da construção de seu acesso (BRASIL, 1999).

Uma das ações realizadas pela ANVISA para garantir a segurança da saúde da população é o registro de medicamentos, etapa na qual os mesmos são avaliados quanto a sua segurança, eficácia e qualidade antes de serem expostos a venda para utilização pela população (BRASIL, 1999).

A regulamentação em vigor para o registro de medicamentos fitoterápicos é a Resolução de Diretoria Colegiada (RDC) 48/2004, que determina os aspectos essenciais ao registro, como identificação botânica das espécies vegetais utilizadas, padrão de qualidade, identidade, provas de eficácia e segurança que validem as indicações terapêuticas propostas. Há ainda as Resoluções Específicas (RE): RE 88/2004, que contempla a Lista de referências bibliográficas para avaliação de segurança e eficácia de fitoterápicos; RE 89/2004, que contempla a Lista de registro simplificado de fitoterápicos; RE 90/2004, contendo o Guia para realização dos testes de toxicidade pré-clínica de fitoterápicos; e RE 91/2004, que trata do Guia para realização de alterações, inclusões, notificações e cancelamento pós-registro de fitoterápicos (BRASIL, 2004 a,b,c,d,e).

Além das anteriormente descritas, se aplicam ao registro de fitoterápicos, todas as legislações que normatizam o registro de medicamentos, como a RDC 17/2010, que dispõe sobre as Boas Práticas de Fabricação de Medicamentos (BRASIL, 2010)

## 2.6.2 Produtos comerciais de enxaguatórios bucais contendo bioativos.

As plantas medicinais constituem importantes recursos terapêuticos para o tratamento da saúde. A abrangência da utilização de fitoterápicos é vasta e engloba fins variados, sobretudo em relação à saúde bucal. A eficácia de tais plantas, empregadas em enxaguatórios bucais, tem sido investigada para o tratamento de várias afecções bucais e os resultados sugerem que tais princípios ativos podem ser utilizados como apoio à terapia das doenças periodontais e como profilaxia de rotina (PALOMO, 2009).

Alguns componentes de óleos essenciais tais como timol, eucaliptol, mentol, e outros, têm sido empregados nos tratamentos de afecções bucais. Em relação ao

produto industrializado como enxagüatório bucal, o produto Listerine® (Warner-Lambert) é amplamente conhecido e comercializado. Estudos de curta duração demonstram que ocorreu a 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% na gengivite. Este 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 foram citados a sensação de queimação e ardência na boca (BUGNO *et al.*, 2006).

Outros enxagüatórios bucais industrializados contendo ervas medicinais são: Sorriso Herbal® (Kolynos do Brasil) contem em associação a camomila, sálvia, mirra, melaleuca e eucalipto. Outro produto, Sorriso Herbal® com cálcio contém erva doce, melissa e hortelã e o produto Parodontax® (GSK) que é uma associação de tintura de equinácea, mirra, ratânia, sálvia e camomila (BUGNO *et al.*, 2006).

Estudos clínicos confirmam a eficácia do dentifrício Parodontax® na redução do biofilme bacteriano, do sangramento gengival e de gengivites. Outros produtos são comercializados pela Indústria 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 (BUGNO *et al.*, 2006).

Estudos mostraram que componentes vegetais podem reduzir significativamente os índices na formação de biofilme, diminuir os índices de sangramentos gengivais e anteparar afecções bucais. Assim, 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. 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 para este processo (PALOMO, 2009).

## 2.7 Considerações sobre espécies vegetais empregadas na preparação de enxaguatórios bucais

### 2.7.1 *Mentha arvensis*



Figura1: *M. arvensis* cultivada no horto da Faculdade de Farmácia da UFJF

As plantas do gênero da *Mentha* são oriundas da Europa e Oriente Médio e foram trazidas para o Brasil no período da colonização. Existem diversas espécies de menta, mais do que se consegue identificar, pois a polinização das várias espécies ocorre de forma cruzada, originando novos híbridos. O gênero *Mentha* compreende cerca de 25 espécies diferentes e correlatos que pertencem a família Lamiaceae (SIMÕES *et al.*, 2004)

São plantas herbáceas e perenes, de crescimento rápido e fácil, com caules violáceos e ramificados, folhas opostas, serradas e cor variando entre verde-claro e verde-escuro, flores lilases ou azuladas dispostas em espigas terminais, fruto tipo aquênio (LIMA, 2003).

Uma das espécies mais cultivadas no Brasil é a *Mentha arvensis*. Anualmente a produção mundial é de cerca de 16.000 toneladas. O óleo desta é obtido a partir das folhas e flores e são destinados ao uso na indústria de alimentos,

medicamentos, aromatizantes e fragrâncias. Os maiores produtores são a China, Índia, Brasil, Japão, França e Estados Unidos (SRIVASTAVA *et al.*, 2002).

A *Mentha arvensis* é popularmente conhecida como menta doce, hortelã-japonesa, vique, hortelã-pimenta, hortelã-das-cozinhas e menta-inglesa. Ela pode apresentar um rendimento de até 5% em óleo essencial, porém é mais comum um rendimento de 1% a 2%. Seu principal componente é o mentol (de 50% a 70% e em alguns casos 90%) (RAJESWARA , 1999).

Depois do mentol ser removido do óleo (desmentolado), restam ainda 17% a 35% de mentona, 5% a 13% de metil acetato, 2% a 5% de limoneno e 2,5% a 4% de neomentol. Existem ainda traços de outros terpenos como piperone, pulegone, entre outros (SARTORATTO *et al.*, 2004).

As ações terapêuticas atribuídas ao óleo essencial de *Mentha arvensis* são: antiespasmódica, expectorante, antihistamínica, colagoga, carminativa, antiséptica, tônica e estimulante sobre o aparelho digestório, anti-emética e antitérmica. (LORENZI e MATOS, 2002).

No que se refere aos extratos aquosos e óleo essencial das Menthas estudos comprovam que possuem ação contra várias cepas bacterianas, tais como: *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Enterobacter aerogenos*, *Proteus vulgaris*, *Salmonella typhimurium*, *Klebsiella pneumoniae*, *Enterococcus faecium*, entre outras. Bem como, no combate a levedura *Cândida albicans* (AH MAD e BEG, 2001; BERTINI *et al.*, 2005)

### 2.7.2 *Eucalyptus globulus*



Figura 2: Árvore de *Eucalyptus globulus* cultivada próximo ao prédio da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal de Juiz de Fora.

A planta do gênero *Eucalyptus globulus* (Figura 2) pertence à família das Myrtaceae. São árvores, em alguns raros casos, arbustos. O gênero inclui mais de 700 espécies, quase todas originárias da Austrália. Adaptados a praticamente a todas as condições climáticas. No Brasil foi implantado em 1909 e atualmente existem extensas áreas plantadas, sobretudo, no Estado de Minas Gerais (SIMÕES *et al.*, 2004).

*Eucalyptus globulus* é cultivado para obtenção de madeira como combustível, de celulose para fabricação de papel e para extração do óleo essencial medicinal. A análise fitoquímica das folhas mostra como principal componente o óleo essencial eucaliptol, acompanhado de vários monoterpenos, sesquiterpenos, taninos, dentre outros metabólitos secundários, com propriedades medicinais. O eucalipto tornou-se uma das plantas mais cultivadas do mundo devido as suas diversas aplicações como nas indústrias farmacêuticas, de perfumaria, na extração de madeira e produção de papel. Diferentes espécies dessa planta são bastante utilizadas na medicina tradicional da China para várias situações médicas (NASCIMENTO *et al.*, 2010).

Fundamentado no conhecimento da medicina popular, diversos estudos têm sido reportados na literatura sobre as propriedades químicas, biológicas e medicinais do eucalipto, tais como a sua atividade antimicrobiana, larvicida, analgésica e antiinflamatória (CHAGAS *et al.*, 2002).

Segundo Batish *et al.* (2008), a bioatividade do eucalipto pode estar diretamente correlacionada com a sua composição química, que apresentam como componentes majoritários: 1,8 cineol, citronelal, citronelol, p-cimeno, limoneno, linalol,  $\alpha$ -pineno,  $\gamma$ -terpineno e  $\alpha$ -terpineol.

### 2.7.3 Óleo de Gergelim

A espécie *Sesamum indicum*, popularmente conhecida como gergelim ou sésamo é uma planta anual herbácea, originária do Oriente, pertencente à família das pedaliáceas. Apresenta muitas propriedades medicinais já estudadas e confirmadas, como antiinflamatória e antimicrobiana. Forma sementes oleaginosas, pequenas, amarelas, alvas ou pretas, arredondadas e levemente comprimidas (SIMÕES *et al.*, 2004).

As sementes de gergelim apresentam alto teor de óleo, chegando a representar de 44 a 58% da semente. Este óleo possui grande resistência à rancificação devido a presença de compostos fenólicos como o sesamol e tocoferóis. Após a extração do óleo, obtém-se o farelo desengordurado, o qual apresenta alto teor protéico e de fibras, podendo ser utilizado como fonte alternativa de proteínas e energia para grupos humanos. (ADEL *et al.*, 2011).

O gergelim é o alimento utilizado por milhões de indivíduos, sendo ingerido, principalmente como farinha e óleo. As sementes de gergelim possuem elevado valor nutricional, devido à quantidade significativa de vitaminas (MORRETO e FETT, 1998)

As sementes fornecem um óleo muito rico em ácidos graxos insaturados, oléico e linoléico (EMBRAPA, 2006). As sementes de gergelim são ricas em manganês, cobre e cálcio (90 mg de cálcio por colher de sopa para sementes integrais (não descascadas) e 10 mg para sementes descascadas), e contém Vitamina B1 e Vitamina E. Possuem um poderoso antioxidante (chamados "lignans" em inglês), que também é anticancerígeno. Também contém fitoesteróis, que bloqueiam a produção de colesterol (ADEL *et al.*, 2011).

Entre os ácidos graxos, encontra-se a lecitina, que desempenha um papel importante no nosso organismo. É um poderoso emulsionante que facilita a dissolução das gorduras em meio aquoso. É componente essencial do tecido nervoso, também se encontra no sangue, no sêmen e na bile e intervém na função das glândulas sexuais (RAMESH *et al.*, 2005).

Muitos estudos têm mostrado utilização de alimentos à base de *Sesamum indicum* para suplementação de dietas humanas, como unguento em dores musculares, levemente laxante e também apresentou atividade antimicrobiana (LORENZI e MATOS, 2002).

### **3 OBJETIVOS**

#### **3.1 Objetivo Geral**

Desenvolver uma formulação de um enxaguatório bucal bifásico, utilizando os extratos aquosos das folhas de *Mentha arvensis*, *Eucalyptus globulus* e o óleo de gergelim, que seja seguro e eficaz.

#### **3.2 Objetivos Específicos**

1. Investigar o potencial antimicrobiano dos extratos aquosos e óleo essencial das folhas *Mentha arvensis* e *Eucalyptus globulus* e o óleo de gergelim em cepas padrões de *Streptococcus mutans* ATCC 25175.
2. Investigar o potencial antinociceptivo e antiinflamatório do óleo de gergelim.
3. Desenvolver uma formulação do enxaguatório bucal bifásico com os extratos aquosos das folhas de *Mentha arvensis*, *Eucalyptus globulus* e o óleo de gergelim.

## 4 MATERIAL E MÉTODOS

### 4.1 Material

#### 4.1.1 Amostras

As folhas de *Mentha arvensis* e *Eucalyptus globulus* foram coletadas no Horto de Plantas Medicinais da Faculdade de Farmácia e Bioquímica da Universidade Federal de Juiz de Fora (UFJF) em Janeiro de 2012. A identificação destas foram realizadas pela botânica Rosângela Siqueira, sendo uma exsicata de cada espécie depositada no Herbário Leopoldo Krieger (CESJ) do Instituto de Ciências Biológicas da UFJF, a *Mentha arvensis* sob o número do tombo: CESJ 57544 e *Eucalyptus globulus* UFJF sob o número do tombo: CESJ 59293.

O óleo de gergelim (Hong Kong®) adquirido do comércio, originário da China, foi extraída da semente crua de gergelim por prensagem a frio, sem uso de solventes e sem refinamento.

Foi utilizado para avaliação comparativa, o enxaguatório bucal comercial contendo gluconato de clorexidina 0,12% (Periogard®-Colgate) e substância padrão de gluconato de clorexidina (Smart®), pureza 99,8 %.

#### 4.1.2 Cepa de microrganismo padrão empregado na avaliação da atividade antimicrobiana

A cepa padrão de bactéria foi *Streptococcus mutans* ATCC 25175, lote 0307015, doada pelo Laboratório de Microrganismos de Referência da Fundação Oswaldo Cruz (FIOCRUZ), Rio de Janeiro, Janeiro de 2012.

#### 4.1.3 Animais usados para ensaio de toxicidade aguda, ação antiinflamatória e antinociceptiva.

Foram utilizados camundongos *Swiss* (25-30 g) e ratos *Wistar* (200-240 g) machos provenientes do Centro de Biologia da Reprodução da UFJF. Os animais foram mantidos em gaiolas de polipropileno (47x34x18 cm) com ração e água *ad libitum* em temperatura ambiente ( $22 \pm 2^\circ\text{C}$ ) durante 3 dias no ciclo claro/escuro de

12 horas (claro de 06:00 às 18:00 horas). Doze horas antes da realização dos experimentos, os animais foram privados de alimentação. Os protocolos utilizados foram aprovados pelo Comitê de Ética na Experimentação Animal desta instituição (nº 053/2009 e nº 054/2009).

## 4.2 Métodos

4.2.1 Preparação dos extratos aquosos de *Mentha arvensis* e *Eucalyptus globulus* (BIAVATTI e LEITE, 2000).

Após coleta, as folhas foram submetidas à dessecação em temperatura de 50 °C, com ventilação forçada até perda de 97% de sua umidade. As folhas secas foram reduzidas ao estado de pó através de moagem e padronizados com auxílio de tamises de 150 e 75 µm.

O extrato aquoso de cada planta foi preparado pesando-se 25 gramas das folhas secas trituradas. Adicionou-se 250 mL de água destilada esterilizada fervente, sendo a mistura deixada em repouso por 15 minutos. Posteriormente este extrato foi filtrado e em seguida foram feitas as diluições seriadas com água destilada esterilizada dos extratos de cada planta.

4.2.2 Pesquisa de classes químicas do metabolismo secundário dos extratos aquosos da *Mentha Arvensis* e *Eucalyptus globulus*. (BIAVATTI e LEITE, 2000).

Pesquisou-se através do extrato aquoso de *Mentha Arvensis* e *Eucalyptus globulus* os seguintes metabólitos secundários:

### Flavonóides:

**Reação de Shinoda:** colocou-se 2 mL do extrato em tubo de ensaio e adicionou-se fragmentos de magnésio e 10 gotas de ácido clorídrico concentrado. Após desprendimento do gás hidrogênio, o aparecimento de coloração com tonalidade avermelhada caracterizou presença de flavonóides

**Reação com cloreto férrico:** em um tubo de ensaio colocou-se 2 mL do extrato e adicionou-se cerca de 5 gotas da solução de cloreto férrico a 2% p/v.

Colorações verde, amarelo, verde-castanho ou violáceo caracterizaram a presença de flavonóides.

#### Taninos:

**Reação com sais de chumbo:** adicionou-se ao extrato gotas de solução aquosa a 10% p/v de acetato de chumbo. Reação positiva: turvação a precipitação.

**Reação com sais de cobre:** juntaram-se ao extrato algumas gotas de uma solução aquosa de acetato de cobre a 3% p/v. Reação positiva: turvação a precipitação.

**Reação com proteínas (gelatina):** acrescentou-se ao tubo contendo o extrato aquoso uma gota de solução de ácido clorídrico 10% v/v e depois, gota a gota, a solução de gelatina a 2,5% p/v. Reação positiva: turvação a precipitação.

**Reação com sais de ferro (cloreto férrico):** ao extrato aquoso adicionaram-se algumas gotas da solução de cloreto férrico a 2% p/v. Observe a coloração do colóide que se forma. Os taninos hidrolisáveis: coloração azul-violeta. Os taninos condensados: coloração esverdeada.

#### Saponinas:

Colocou-se 1 grama da amostra em pó ou fragmentada em tubo de ensaio; adicionou-se 10 mL de água destilada, ferver por 2 minutos, resfriar e agitar energicamente por 15 segundos. Reação positiva: formação de persistente de espuma

4.2.3 Determinação da atividade antimicrobiana em meio de cultura sólido por técnica de difusão em Agar, segundo técnica adaptada da Farmacopéia Brasileira 5ª ed., 2010 e United States of Pharmacopeia, 32ª ed, 2009.

#### **Preparo da suspensão padronizada das cepas dos microrganismos padrões:**

Repicou-se para um tubo de ensaio contendo meio de cultura inclinado, sendo usado *Tryptic Soy Agar* (TSA) (Difco®). Incubou-se em estufa (FANEN®) as placas contendo TSA a  $34 \pm 2$  °C por cerca de 24 horas.

A suspensão microbiana foi diluída em solução fisiológica esterilizada, para obter transmitância de 25% a 580 nm em espectrofotômetro modelo SP 432

(FENTO®). A partir desta suspensão foram realizadas diluições decimais seriadas utilizando solução fisiológica esterilizada até a diluição  $10^{-7}$ . Das três últimas diluições, foi transferido 1 mL para placa de *Petri*, em duplicata. Transferiu-se para as placas 20 mL do meio de cultura *Tryptic Soy Agar* (Difco®). As placas contendo TSA foram incubadas a  $34\pm 2^{\circ}\text{C}$  por cerca de 24 horas. Após este período será feita a contagem das colônias em cada placa, sendo determinado o número de unidades formadoras de colônia (UFC) por mL da suspensão microbiana.

#### **Determinação da atividade antimicrobiana em meio de cultura sólido por técnica de difusão em Agar:**

Transferiu-se 15 mL de meio de cultura *Tryptic Soy Agar* (Difco®) fundido em placa de *Petri* esterilizadas. Sobre esta superfície do meio solidificado foi adicionado volume de 4 mL de meio de cultura *Tryptic Soy Agar* (Difco®) fundido e com temperatura média de  $45^{\circ}\text{C}$  inoculado com 1% da suspensão microbiológica de *Streptococcus mutans* ATCC 25174 padronizada a 25% transmitância (580 nm).

Em seguida, 0,1 mL das amostras testadas e padrões foram introduzidos para os cilindros previamente colocados sobre o meio de cultura já solidificado. Aguardou-se cinco minutos para as substâncias testadas difundissem para o meio. As placas foram incubadas a  $34\pm 2^{\circ}\text{C}$  por cerca de 24 horas. Após esse período os halos de inibição foram medidos com o auxílio de uma régua. Este ensaio foi realizado em triplicata e em três dias diferentes

4.2.4 Avaliação da concentração inibitória mínima (CIM) do extrato aquoso de *Mentha arvensis*, *Eucalyptus globulus* e do óleo de gergelim , método adaptado de diluição em meio de cultura líquido (*Kirb-Bauer*).

Foram realizadas 4 diluições decimais sucessivas dos extratos testados a partir da solução que apresentou atividade no teste de difusão em agar.

Controle positivo: acrescentou-se 4 mL de *Tryptic Soy Broth* (Difco®) inoculado com  $10^3$  a  $10^4$  UFC/mL de *Streptococcus mutans* padronizado anteriormente e 1mL de solução fisiológica esterilizadas a um tubo de ensaio esterilizado em triplicata. Controle negativo: acrescenta-se 4 mL de de *Tryptic Soy*

*Broth* (Difco®) e 1 mL de solução fisiológica esterilizados a um tubo de ensaio esterilizado, em triplicata.

No preparo dos tubos testes acrescentou-se 4 mL de *Tryptic Soy Broth* (Difco®) inoculado e 1 mL de cada concentração da amostra diluída preparada em diferentes tubos, em triplicata para cada concentração.

Os tubos foram incubados a  $34 \pm 2^\circ \text{C}$  por cerca de 24 horas. Dos tubos nos quais não foi observada a turvação, foi transferida uma alíquota de 1 mL para tubos de ensaio contendo 4 mL de *Tryptic Soy Broth* (Difco®) estéreis incubados nas mesmas condições anteriores.

Caso tenha ocorrido a turvação confirma a presença da atividade bacteriostática e ocorrendo ausência de turvação determina a atividade bactericida.

#### 4. 2.5 Determinação da concentração Inibitória Mínima de Aderência (CIMA) do *Streptococcus mutans* ATCC 25175 a uma superfície (FREIRES *et al.*, 2010)

A concentração inibitória mínima de aderência (CIMA) da bactéria ao vidro foi determinada na presença de sacarose a 5%, usando-se diluições seriadas decimais das concentrações dos extratos aquoso de *Mentha arvensis* e de *Eucalyptus globulus*.

A partir deste foi distribuídos 1,8 mL *Brain Heart Infusion* (Difco®) inoculados com  $10^6$  UFC/ mL da bactéria *Streptococcus mutans*, em tubos de ensaio pequenos, em seguida foi adicionado 0,2 mL da solução correspondente a cada diluição dos extratos e padrões.

Foram incubados a  $34 \pm 2^\circ \text{C}$  por cerca de 24 horas, estes tubos foram inclinados a  $30^\circ$  na estufa para permitir uma melhor visualização da aderência. A leitura foi realizada através da observação visual da aderência da massa de bactérias às paredes do tubo após agitação do mesmo.

A CIMA foi definida como a menor concentração dos extratos que impediu a aderência ao tubo de vidro.

#### 4.2.6 Determinação da atividade antiinflamatória e antinociceptiva do óleo de gergelim

##### 4.2.6.1 Avaliação da toxidez aguda para o óleo de gergelim

Grupos de 10 camundongos receberam doses de 0,5; 1,0; 1,5; 2,0 e 3,0 g/kg do óleo de gergelim por via oral, enquanto o grupo controle recebeu solução salina. Os grupos foram observados por 48 horas, registrando-se a mortalidade dos animais (DIETRICH, 1983). A DL50 foi determinada através do método dos probitos usando a porcentagem da mortalidade e o logaritmo das doses seguidas de regressão linear (LITCHFIELD; WILCOXON, 1949).

#### 4.2.6.2 Teste de Contorções Abdominais para o óleo de gergelim

O óleo de gergelim (100, 200 ou 400 mg/kg; 0,01 mL/g) foi administrado em camundongos, por via oral (v.o.), uma hora antes da aplicação de 10 mL/kg de ácido acético 0,6% (n = 8) (KOSTER *et al.*, 1959; COLLIER *et al.*, 1968) intraperitonealmente. O número de contorções abdominais foi contado entre 10 e 30 minutos após injeção do ácido acético. O grupo controle recebeu 10 mL/kg de salina (v.o.). Indometacina (10 mg/kg, v.o.) e ácido acetilsalicílico (200 mg/kg, v.o.), antiinflamatórios não-esteróides, foram usados como controles positivos.

#### 4.2.6.3 Teste da Formalina para o óleo de gergelim

Um volume de 20 µL de formalina 2,5% (em salina esterilizada) foi aplicado no espaço subplantar da pata direita dos camundongos (n = 8) e a duração do tempo de lambida foi determinado de 0 a 5 minutos (1ª fase) e 15 a 30 minutos (2ª fase) (HUNSKAAR; HOLE, 1987). O óleo de gergelim foi administrado nas doses de 100, 200 ou 400 mg/kg (v.o.) 1 hora antes da injeção da formalina. Os animais controles receberam 10 mL/kg de salina (v.o.) e a morfina (5 mg/kg, s.c.) e indometacina (10 mg/kg, v.o.) foram usadas como controles positivos.

#### 4.2.6.4 Teste da Placa Quente para o óleo de gergelim

Quatro grupos de oito camundongos foram tratados com salina ou o óleo de gergelim (100, 200 ou 400 mg/kg, v.o.; 0,1 mL/10 g). Os animais foram colocados em placa quente aquecida a 55±1 °C (EDDY; LEIMBACH, 1953). As medidas foram realizadas nos tempos zero, 30, 60 e 90 minutos após administração do óleo, com tempo máximo de permanência sobre a placa quente de 30 segundos. Em outro

grupo de animais, o efeito do pré-tratamento com naloxona (1 mg/kg, s.c.) sobre a analgesia produzido pelo extrato (400 mg/kg, v.o.) foi determinado. Morfina (5 mg/kg, s.c.), na ausência e na presença de naloxona, foi usada como controle positivo.

#### 4.2.6.5 Edema De Pata Induzido Por Carragenina para o óleo de gergelim

O edema de pata foi induzido pela injeção de 0,1 mL de carragenina (2% p/v) em salina esterilizada e administrada na região subplantar da pata direita de ratos Wistar machos (n = 6). Uma hora antes da injeção de carragenina, o óleo de gergelim foi administrado (v.o.) nas doses de 100, 200 ou 400 mg/kg (WINTER *et al.*, 1962). O grupo controle recebeu 10 mL/kg de salina (v.o.). Na pata esquerda, usada como controle, foi injetada 0,1 mL de salina esterilizada. Após quatro horas de injeção de carragenina, a medida do edema foi feita pela diferença entre o volume da água deslocado da pata direita e o da pata esquerda utilizando um pletismômetro. Indometacina (10 mg/kg, v.o.) foi usada como controle positivo.

#### 4.2.6.6 Pleurisia Induzida Por Carragenina para o óleo de gergelim

A pleurisia foi induzida em ratos Wistar pela injeção intrapleural de 0,5 mL, entre a terceira e a quinta costela do lado direito do mediastino, de uma suspensão de carragenina 2% em solução salina esterilizada (VINEGAR *et al.*, 1973). Grupos de seis ratos foram tratados com o óleo de gergelim (100, 200 ou 400 mg/kg, v.o.), indometacina (10 mg/kg, v.o.) ou salina (10 mL/kg, v.o.) uma hora antes da aplicação do agente inflamatório. Quatro horas após a indução da inflamação, os animais sofreram aprofundamento de anestesia com cloridrato de cetamina (75 mg/kg) e cloridrato de xilazina (10 mg/kg) seguido de eutanásia. Uma incisão foi feita entre a terceira e quinta costela em cada lado do mediastino. O exsudato pleural foi coletado, transferido a um tubo cônico de centrifuga e o volume foi determinado. Uma alíquota de 20 µL do exsudato foi usada para determinar a contagem total de leucócitos em câmara de *Neubauer*.

4.2.7 Identificação dos compostos principais do Óleo de Gergelim por Cromatografia Gasosa acoplada em espectrometria de Massa – CG/EM (ADAMS, 2007)

A análise CG/EM do óleo foi realizada em cromatógrafo HP5972 acoplado a espectrômetro de massa (Hewlett Packard gás da série 6890). O espectro de Massa analítico nas seguintes condições: HP-5 coluna (30 mx 0,25 mm de espessura de filme x 0,25 microns), hélio (1 mL / min), programado temperatura de 60 ° -240 ° C (3 ° C / min), temperatura do injetor (260 ° C) e uma interface (200 ° C); energia ionização, 70 eV, varredura de intervalo, 30-300 amu, tempo de varredura, 1 s. A identificação de compostos com base no WAS comparação dos índices de retenção (Determinado relativamente aos tempos de retenção de uma série de *n*-alcanos), espectros de massa e do NIST espectrômetro de banco de dados, bem como a comparação com dados da literatura.

### **4.3 Análise estatística dos Dados**

Os dados obtidos foram expressos em tabelas. Para os testes de atividade antiinflamatória e antinociceptiva foi utilizada a análise de variância (ANOVA) seguida de Tukey como *post-hoc* e os dados foram expressos como média e erro padrão da média. Para os testes de determinação da atividade antimicrobiana em meio de cultura sólido por técnica de difusão em Agar foi utilizada análise de variância (ANOVA) seguida de Tukey como *post-hoc* e os dados foram expressos como média e desvio padrão da média. Todos os testes foram bicaudais e o nível de significância de no mínimo 5%, utilizando o software *Statistical Package for Social Sciences* (SPSS), versão 13 para Windows (Chicago, IL, Estados Unidos).

## 5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 5.1 Pesquisa das classes químicas do metabolismo secundário dos extratos aquoso da *Mentha arvensis* e *Eucalyptus globulus*.

**Tabela 1** Ensaio fitoquímico realizado de avaliação com dos extratos aquosos de *Mentha arvensis* e *Eucalyptus globulus* para determinar a presença ou ausência dos metabólitos secundários flavonóides, taninos e saponinas

ENSAIO FITOQUÍMICO	<i>Mentha arvensis</i>	<i>Eucalyptus globulus</i>
<b>Flavonóides</b>		
Reação de <i>Shinoda</i>	Negativo	Positivo
Reação com cloreto férrico	Negativo	Positivo
<b>Taninos</b>		
Reação com sais de chumbo	Negativo	Positivo
Reação com sais de cobre	Negativo	Positivo
Reação com proteínas (gelatina)	Negativo	Positivo
Reação com sais de ferro (cloreto férrico)	Negativo	Positivo (azul violeta)
<b>Saponinas</b>		
Formação de espuma persistente	Negativo	Positivo

Os ensaios do *screening* fitoquímico realizados com o extrato aquoso de *Mentha arvensis* e *Eucalyptus globulus* através de reações de grupos funcionais da molécula apresentaram reatividade apenas para *E. globulus*. Sendo positiva a presença das classes dos metabólitos secundários as saponinas, taninos hidrolisáveis e flavonóides, como mostra a tabela 1. Vale ressaltar que foram considerados apenas os extratos aquosos das plantas analisadas, podendo assim certos grupos de metabólito secundário não terem sido extraídos.

Espécies do gênero *Eucalyptus* destacam-se no reino vegetal pela sua alta importância, tanto por seu valor econômico como em seus benefícios medicinais. Vários estudos têm sido conduzidos com diferentes espécies do gênero *Eucalyptus*,

visando à pesquisa de atividades biológicas e a avaliação do potencial medicinal (BROPHY e SOUTHWELL, 2002).

Os taninos são constituintes fenólicos que usualmente formam complexos insolúveis em água com alcalóides, gelatina e outras proteínas. Estes compostos são particularmente importantes componentes gustativos, sendo responsáveis pela adstringência de muitos frutos e produtos vegetais. A complexação entre taninos e proteínas é a base para suas propriedades como fatores de controle de insetos, fungos e bactérias tanto quanto para suas atividades farmacológicas. Esta classe de metabólitos apresenta ampla distribuição, ocorrendo em quase todas as famílias. Plantas ricas em taninos são empregadas na medicina tradicional no tratamento de diversas moléstias, tais como diarreia, reumatismo, hemorragias, feridas, queimaduras, problemas estomacais (azia, náusea, gastrite e úlcera gástrica), problemas renais e do sistema urinário e processos inflamatórios em geral (SIMÕES, 2004).

De acordo com Franco (2005), é comum encontrar além dos taninos, glicosídeos flavônicos nos representantes do gênero *Eucalyptus*. No extrato aquoso de *E. globulus* deste estudo também observou-se a presença de grupos flavônicos. Os flavonóides já possuem diferentes propriedades farmacológicas estudadas. Ensaio biológicos usando combinações isoladas revelam que os flavonóides exibem atividade antimicrobiana, antiviral, antiulcerogênica, antihipertensivo, hipolipidêmico, antiinflamatório e antiplaquetário. Ação também no aumento na permeabilidade capilar, inibição da exudação protéica e migração de leucócitos (PELZER *et al.*, 1998). Estes efeitos podem estar relacionados às propriedades inibitórias que os flavonóides desempenham nos vários sistemas enzimáticos incluindo hidrolases, isomerases, oxigenases, oxidoredutases, polimerases, fosfatases, proteínas fosfoquinases e aminoácido oxidases (FERGUSON, 2001).

A formação de espuma persistente no extrato aquoso de *E. globulus* caracterizou a presença de saponinas. A principal característica das saponinas é apresentar atividade tensoativa, isto é, esses compostos são capazes de formar soluções espumantes persistentes e abundantes quando em solução aquosa. Fabrowski (2002) ao estudar o gênero *Eucalyptus* constatou a presença saponinas. Sabe-se que estas possuem propriedades biológicas determinadas pelo seu comportamento anfifílico e pela habilidade em formar complexos com esteróides, proteínas e fosfolípídeos de membrana (SIMÕES, 2004).

As saponinas são glicosídeos de esteróides ou de terpenos policíclicos. Esse tipo de estrutura, que possui uma parte com característica lipofílica (triterpeno ou esteróide) e outra parte hidrofílica (açúcares), determinam a propriedade de redução da tensão superficial da água e de suas ações detergentes e emulsificantes (SIMÓES *et al.*, 2004). Possui também ação antifúngica e antimicrobiana já comprovada, o mecanismo de ação sugerido é a interação com os esteróis da membrana dos microrganismos, desestabilizando-os e levando à lise da célula bacteriana (BRUM, 2006).

## **5.2 Determinação da atividade antimicrobiana em meio de cultura sólido por técnica de difusão em Agar, segundo técnica adaptada da Farmacopéia Brasileira 5ª ed., 2010.**

Os ensaios foram realizados em triplicata e em três dias diferentes. Os extratos aquosos das plantas foram denominados com relação a sua diluição, sendo para o extrato de *E. globulus*, a solução E1 (100 mg/mL): o primeiro extrato e posteriormente com diluições sucessivas fez-se E2 (50 mg/mL), E3 (25 mg/mL) e E4(12,5 mg/mL).

O mesmo fez-se para *M. arvensis* obtendo-se os extratos M1(100 mg/mL), M2(50 mg/mL), M3 (25 mg/mL) e M4 (12,5 mg/mL). O sustância padrão de clorexidina e a amostra comercial contendo clorexidina foram testadas na concentração de 1,2 mg/mL.

Os extratos aquosos de *M. arvensis* testados não apresentaram atividade antimicrobiana no método testado, frente ao *S. mutans*, como observado na figura 3.

Na literatura há estudos que relatam atividade antimicrobiana do óleo essencial de *M. arvensis* para diversas bactérias Gram negativas e positivas e também ação fungicida (ELGAYYAR, 2001), mas não foi encontrado relatos de alguma atividade antimicrobiana com extratos aquosos na literatura.

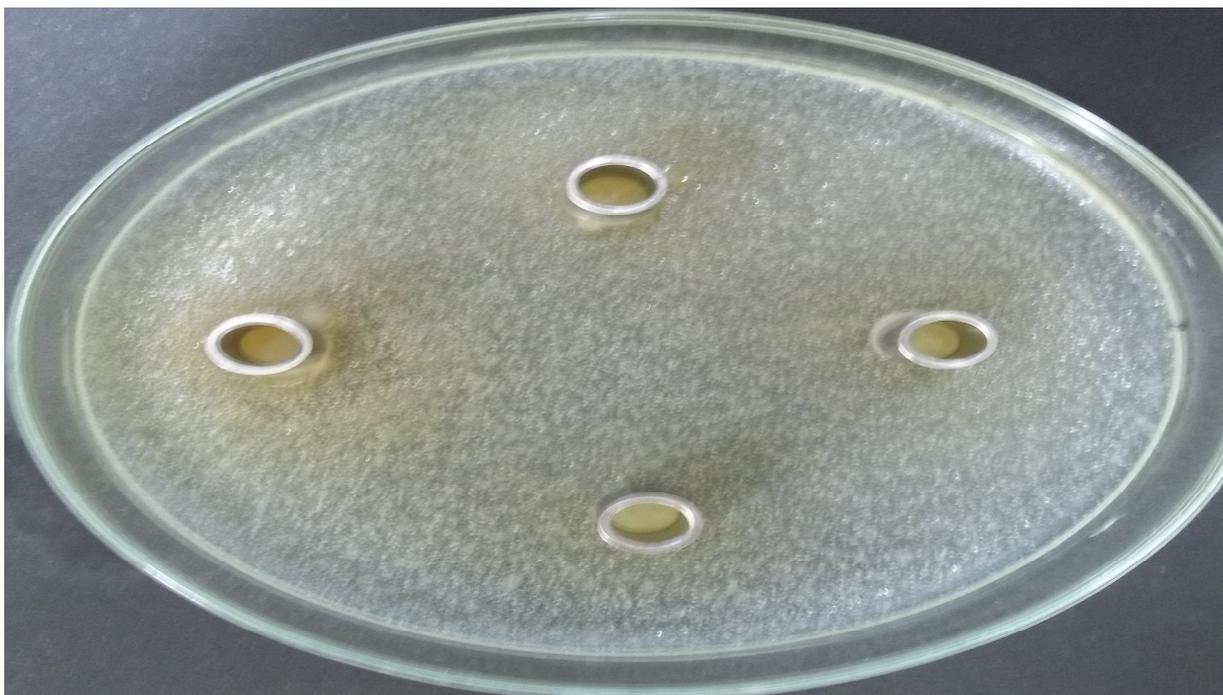


Figura3: Resultado do teste de difusão para o extrato aquoso de *M. arvensis*. Observando os extratos M1(100 mg/mL), M2(50 mg/mL), M3 (25 mg/mL) e M4 (12,5 mg/mL) no sentido horário da figura.

O óleo de gergelim para o teste de difusão também não apresentou atividade, mas por ser um óleo, o fator de difusão fica comprometido como relata Janssen *et al* (1987). O controle positivo (C+) foi adicionado de água e também não houve inibição. Na figura 4 observa-se estes resultados e o da substância de clorexidina padrão ( $21,6 \pm 0,47$  mm,  $p < 0,05$ ) e amostra comercial ( $20,6 \pm 0,49$  mm,  $p < 0,05$ ), ambos não apresentaram diferença significativa. Para os extratos aquosos de *E. globulus*, houve a formação de halos expressivos (tabela 2) que podem ser visualizados na figura 5.

Em análise estatística utilizando a média dos resultados como comparação os halos não apresentaram diferença significativa entre as amostras E1 ( $20,0 \pm 0,66$  mm), padrão ( $21,6 \pm 0,47$ mm) e amostra comercial ( $20,6 \pm 0,49$ ) de clorexidina.

*E. globulus* é considerado uma planta grande importante, destacando-se no reino vegetal pela sua significância, tanto no ponto de vista medicinal quanto econômico (CRUZ, 1965). Apesar de ser uma espécie muito apreciada, ainda não foram comprovados cientificamente todos os seus benefícios. Há estudo que relatam atividade antimicrobiana e antifúngica ligada ao gênero *Eucalyptus* para os óleos essenciais sendo ativos para microrganismos *S. aureus*, *E. coli*, *S. epidermidis*, *P. aeruginosa* e *C. albicans* (CIMANGA *et al.*, 2002; DELASQUIS *et al.*, 2002).

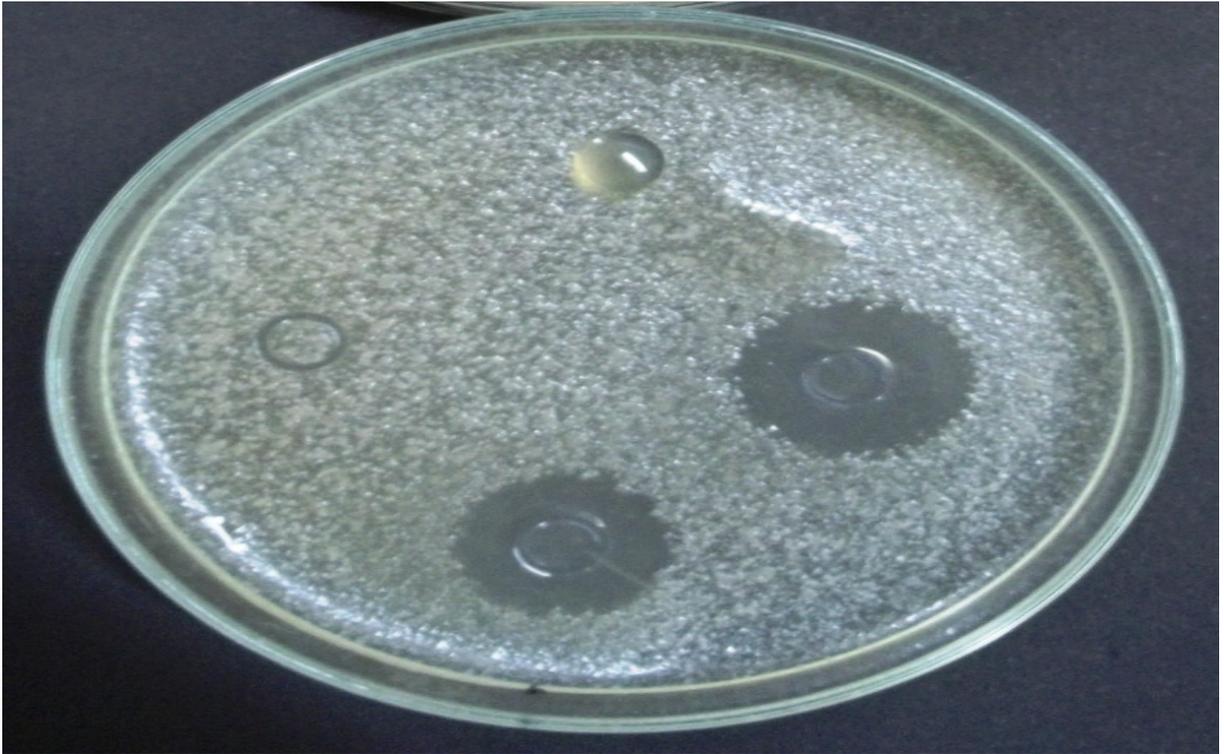


Figura 4: Resultado do teste de difusão para o óleo de gergelim, substância padrão de clorexidina (1,2 mg/mL), amostra comercial de clorexidina (1,2 mg/mL) e água como controle positivo (amostras no sentido horário).

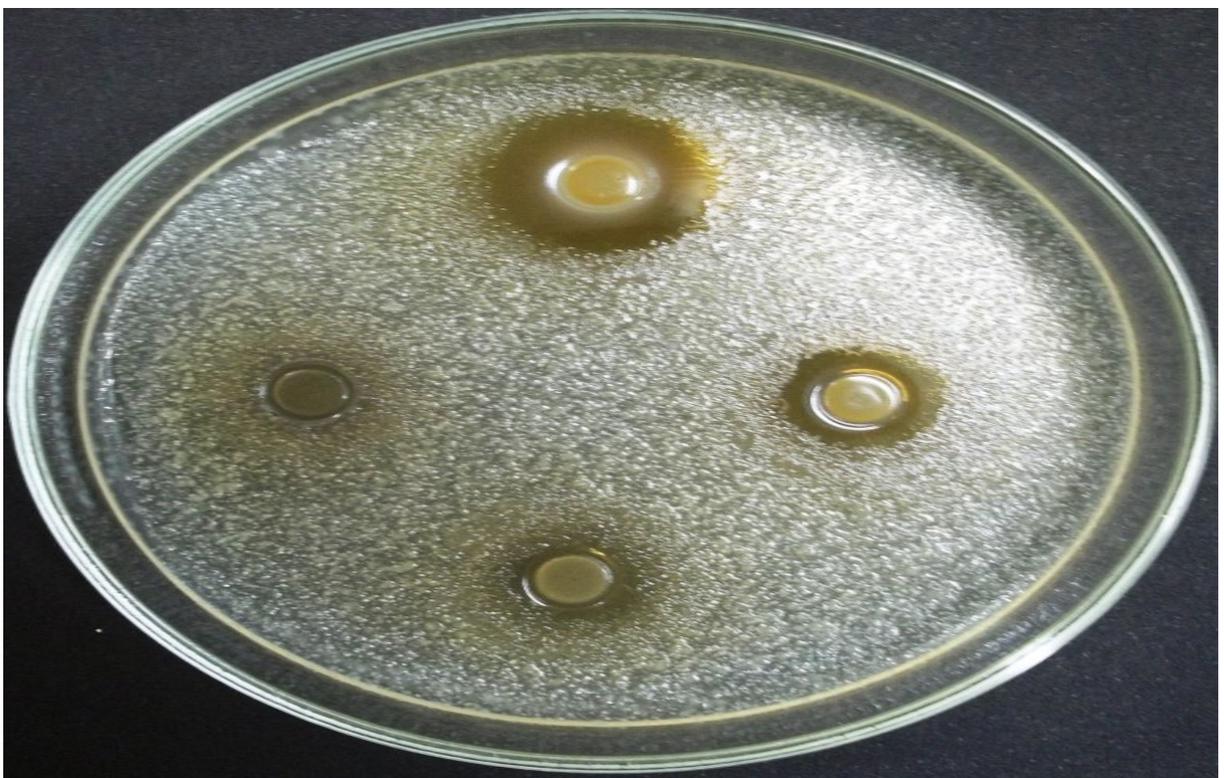


Figura 5: Resultado do teste de difusão para as diluições do extrato aquoso de *E.globulus*. Os halos dos extratos E1 (100mg/mL), E2 (50mg/mL), E3 (25mg/mL) e E4 (12,5 mg/mL) são indicados no sentido horário da figura.

**Tabela 2** Valores do tamanho dos halos de inibição de crescimento (mm) referente ao do extrato de *E. Globulus* (E1, E2, E3), clorexidina – substância padrão (1,2 mg/mL), clorexidina- amostra comercial (1,2 mg/mL) em meio de cultura sólido por técnica de difusão em Agar frente à cepa padrão de *Streptococcus mutans* ATCC 25175.

Dias	E1 (100mg/ mL)	E2 (50mg/ mL)	E3 (25mg/ mL)	Clorexidina - padrão	Clorexidina- Amostra comercial
1	20	14	8	22	20
1	21	14	7	22	21
1	20	14	8	22	21
2	20	14	8	22	21
2	19	14	8	21	20
2	19	14	8	21	20
3	20	13	8	22	21
3	20	14	8	22	21
3	21	14	8	21	21
<b>Média ± desvio padrão</b>	<b>20,0 ± 0,66*</b>	<b>13,8 ± 0,31</b>	<b>7,8 ± 0,31</b>	<b>21,6 ± 0,47*</b>	<b>20,6 ± 0,49*</b>

\*  $p < 0,05$ , diferença significativa em relação a Clorexidina - padrão

### 5.3 Avaliação concentração mínima inibitória (CIM) do extrato aquoso de *Mentha arvensis*, *Eucalyptus globulus* e do óleo de gergelim pelo método adaptado de diluição em meio de cultura líquido (*Kirb-Bauer*).

Para os extratos de *M. arvensis* todas as diluições testadas M1 (100 mg/mL); M2 (50 mg/mL); M3 (25 mg/mL); M4 (12,5 mg/mL) e M5 (6,25 mg/mL); após o tempo de incubação preconizado no método apresentaram crescimento (turvação) e condizendo com o resultado do ensaio de difusão em Agar, não apresentaram atividade em relação a cepa *S. mutans* ATCC 25175.

A CIM para as diluições de clorexidina-padrão foi de 12,5 ug/mL. A determinação dos valores de CIM dos extratos de *E. globulus*, óleo de gergelim e da substância padrão de clorexidina estão expressos na tabela 3.

A diluição OG4 (Figura 8) apresentou turvação, fez-se o repique da diluição OG3 para outro tudo e depois de 24 horas incubados não ocorreu turvação caracterizando uma ação bactericida.

Os extratos de *E. globulus* junto com o meio de cultura líquido (TSB) usado no ensaio naturalmente já apresentavam turvação (Figura 6). Esta turvação é provavelmente explicada pela presença dos taninos nestes extratos.



Figura 6: Determinação da CIM dos extratos aquoso diluídos de *E. globulus*, as diluições seguem da esquerda para direita: E1(100 mg/mL) , E2 (50 mg/mL) ,E3 (25 mg/mL), E4 (12,5 mg/mL) e E5 (6,25 mg/mL). Devido o extrato aquoso ser turvo a solução já apresentava turvação.

Para confirmar se ocorreu atividade antimicrobiana após 24 horas de incubação fez-se o repique de todos os tubos dos extratos de *E. globulus* para outros tubos contendo meio de cultura líquido os quais foram incubados novamente por 24 horas. Não foi possível determinar por este método se a ação é bactericida ou bacteriostática pelo fato dos extratos inicialmente já serem turvos.

A diluição E4 (12,5 mg/mL) foi determinada como a CIM frente a cepa padrão de *S.mutans* ATCC 25175 após o segundo repique ela não apresentou turvação e a diluição E5 apresentou (Figura 7).

Há estudos como os de Cimanga *et al.*( 2002) e Ghalem e Mohamed (2008) os quais confirmaram as propriedades antimicrobianas de óleos essenciais de *E. globulus* mostrando inibição de crescimento significativo para *S. aureus* e *E. coli* isolados de urina humana.

Hammer *et al* (1999) e Cermelli *et al.* (2008) também demonstraram a susceptibilidade das cepas de *E. coli* e *S. aureus*, frente ao óleo essencial da espécie *Eucalyptus polybractea*. No entanto, enfatizaram que pesquisas posteriores deveriam ser realizadas com outros extratos e outras bactérias.



Figura 7: Determinação da CIM para atividade antimicrobiana dos extratos aquosos diluídos de *E. globulus*, pelo repique realizado no primeiro ensaio, as diluições seguem da esquerda para direita E1(100 mg/mL) , E2 (50 mg/mL) ,E3 (25 mg/mL), E4 (12,5 mg/mL) e E5 (6,25 mg/mL).

**Tabela 3** Resultado da CIM para a clorexidina- substância padrão, *E. globulus* e Óleo de gergelim amostra comercial

Clorexidina-Padrão	Turvaço	<i>E. globulus</i>	Turvaço	Óleo de gergelim	Turvaço
100 ug/mL	---	E1 (100mg/mL)	---	OG1(100%)	---
50 ug/mL	---	E2(50mg/mL)	---	OG2(50%)	---
25 ug/mL	---	E3(25mg/mL)	---	OG3(25%)	--- <sup>1</sup>
12,5 ug/mL	--- <sup>1</sup>	E4(12,5mg/mL)	---	OG4(12,5%)	+++
6,25 ug/mL	+++	E5(6,25mg/mL)	+++	OG5(6,25%)	+++

Legenda: ---, não observou turvação nos três tubos; +++ observou turvação nos três tubos; <sup>1</sup> - ação bactericida.



Figura 8: Determinação da CIM do óleo de gergelim. As diluições seguem da esquerda para direita: OG1 (100%), OG2 (50%), OG3 (25%), OG4 (12,5%) e OG5 (6,25%). A partir da OG 4 ocorreu turvação.

#### **5.4 Determinação da concentração Inibitória Mínima de Aderência (CIMA) do *Streptococcus mutans* ATCC 25175 a uma superfície (FREIRES *et al.*, 2010)**

Foi realizado o ensaio de CIMA para o óleo de gergelim, clorexidina-substância padrão, os extratos aquosos diluídos de *E. globulus* e *M. arvensis*. O teste de aderência é compreendido como a concentração mínima de aderência da bactéria ao vidro depois de agitação.

Os resultados para as diluições de clorexidina- substância padrão, *E. globulus* e o óleo de gergelim estão expressos na tabela 4.

No controle mesmo após agitação a massa bacteriana ficou aderida ao vidro. Tanto o controle positivo realizado com vaselina (diluyente do óleo de Gergelim) quanto água destilada (diluyente dos extratos aquosos). O controle negativo não apresentou adesão (Figura 9).

A clorexidina-padrão impediu a aderência até a concentração de 12,5 ug/mL.

Para os extratos de *M. arvensis* nenhum dos extratos impediu a aderência da bactéria *S. mutans* ATCC 25175 ao vidro (Figura 10).

Os extratos de *E. globulus* impediu a aderência da bactéria até a diluição E4 (Figura 11)

Para o óleo de gergelim a CIMA foi OG3 (Figura 12), pois na diluição OG4 (Figura 13) o óleo não mais impediu a aderência da bactéria ao vidro.

**Tabela 4** Resultado da CIMA para a clorexidina- substância padrão, *E. globulus* e Óleo de gergelim amostra comercial

Clorexidina-Padrão	Aderência ao vidro	<i>E. globulus</i>	Aderência ao vidro	Óleo de gergelim	Aderência ao vidro
100 ug/m L	---	E1 (100mg/mL)	---	OG1(100%)	---
50 ug/m L	---	E2(50mg/mL)	---	OG2(50%)	---
25 ug/m L	---	E3(25mg/mL)	---	OG3(25%)	---
12,5 ug/m L	---	E4(12,5mg/mL)	---	OG4(12,5%)	+++
6,25 ug/m L	+++	E5(6,25mg/mL)	+++	OG5(6,25%)	+++

Legenda: ---, não aderiu os três tubos; + + +, aderiu os três tubos.

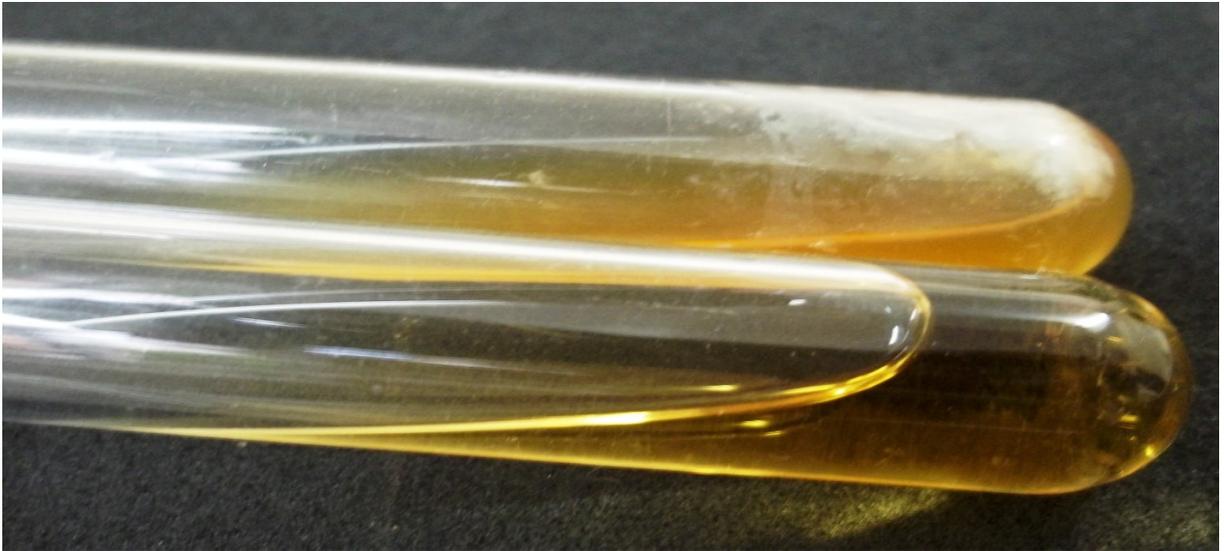


Figura 9: Controle positivo (C+) e negativo (C-) com água destilada do teste de CIMA para o *Streptococcus mutans* ATCC 25175. Sendo que o C+ observa-se a aderência da massa bacteriana ao vidro e o C- não é observado.



Figura 10: Teste de CIMA para os extratos aquosos M1 e M2 da *M. arvensis*. Apresenta aderência ao vidro.



Figura 11: Teste de CIMA para os extratos aquosos de *E. globulus* . Diluições E1, E2, E3, E4 e E5 da esquerda para direita. A diluição E5 apresenta aderência ao vidro.



Figura 12: Teste de CIMA para a diluição OG3 observa-se que não ocorreu aderência ao tubo.



Figura 13: Teste de CIMA para a diluição OG4 observa-se que ocorreu aderência ao tubo.

A superfície dentária normalmente é coberta por uma película adquirida, composta de glicoproteínas salivares e anticorpos que alteram a carga e energia livre da superfície, aumentando a adesão bacteriana, que é o mecanismo inicial para causar uma infecção. Com a disposição de nutrientes, há o crescimento celular das bactérias aderidas às superfícies dentárias, adesão de novas bactérias e síntese de polímeros extracelulares aumentando a massa bacteriana. As primeiras reações das doenças periodontais, frente à presença da placa bacteriana, são inflamatórias e imunológicas com o intuito de proteger a invasão microbiana nos tecidos gengivais. Como já dito uma das bactérias de maior virulência nas infecções bucais são as do gênero *Streptococcus* (WILSON, 2001).

O *Streptococcus mutans* tem sido considerado a principal espécie bacteriana envolvida na formação da placa bacteriana. O único *habitat* natural conhecido de *S. mutans* é a superfície dentária. Os glucanos produzidos por essas bactérias facilitam a aderência e o acúmulo de microrganismos, estabelecendo uma matriz extracelular resistente às forças mecânicas normais de remoção presentes no hospedeiro (BUGNO *et al.*, 2006).

Segundo Groppo *et al* (2008) ao estudarem o uso da fitoterapia na Odontologia, relata que atualmente há uma crescente utilização de agentes fitoterápicos em odontologia, para ajudar a tratar e prevenir problemas bucais. No entanto mais estudos são necessários para avaliar a sua segurança e eficácia para a utilização. Nanayakkara e Ekanayake (2008) verificaram a utilização das tradicionais formas de cuidados com saúde bucal entre 603 adultos no Sri Lanka. Conforme os resultados, a maioria dos problemas bucais que acometiam a população, eram tratados em suas próprias casas por meio de plantas medicinais dentre várias plantas usadas eles empregavam o óleo de gergelim.

Assim para se obter ação antiplaca, os agentes ativos dos enxaguatórios bucais devem reduzir a adesividade das bactérias à superfície dental, inibir o crescimento e proliferação dos microrganismos, inibir a formação da matriz intercelular da placa, modificar a bioquímica bacteriana para reduzir a formação de produtos citotóxicos e modificar a ecologia do biofilme para desenvolvimento de uma flora menos patogênica (MOREIRA *et al.*, 2001).

## 5.5 Avaliação da toxidez aguda do óleo de gergelim

Nenhum dos 10 camundongos que receberam doses de 0,5, 1, 1,5, 2 e 3 g/kg do óleo de gergelim por via oral foram a óbito durante 48 horas de observação. O óleo de gergelim tem seu uso alimentício por milhares de anos e é empregado de várias maneiras, como para preparo dos alimentos e hidratante para pele. (MOHAMED e AWATIF, 1998; MORETTO e FETT, 1998)

## 5.6 Teste De Contorções Abdominais para o óleo de gergelim

O teste das contorções abdominais é utilizado na investigação de novas substâncias com potencial terapêutico. Porém, devido a sua inespecificidade (sensível a drogas da ação central e a drogas de ação periférica) é insuficiente para a determinação do mecanismo responsável pela antinocicepção (KOSTER *et al.*, 1959).

Através deste teste foi possível verificar a atividade antinociceptiva das doses de 200 mg/kg e 400 mg/kg do óleo de gergelim administradas nos camundongos com inibição dose-dependente no números de contorções abdominais. O óleo de gergelim causou redução de 10,33% (200 mg/kg), 20,66% (400 mg/kg), a indometacina inibiu 73,83% e o ácido acetilsalicílico 65,50 % as contorções abdominais em relação ao grupo controle (Tabela 5).

**Tabela 5** Efeito do óleo de gergelim na inibição das contorções abdominais induzidas por ácido acético em camundongos

Grupos	Doses (mg/kg)	Número de contorções	
		Média ± E.P.M.	Inibição (%)
Controle	Salina	67,75±2,37	-
	100	66,50±2,54	-
Óleo de gergelim	200	60,75±2,22*	10,33
	400	53,75±2,17***	20,66
Àcido acetilsalicílico	200	23,37±2,54***	65,50
Indometacina	10	28,37±3,02***	58,12

Valores expressos em média ± erro padrão da média (E.P.M.) para 8 camundongos. \*  $p < 0,05$ ; \*\*  $p < 0,01$ ; \*\*\*  $p < 0,001$  diferença significativa em relação ao grupo controle

## 5.7 Teste da Formalina para o óleo de gergelim

O teste da formalina é composto por duas fases distintas: a primeira que ocorre nos primeiros cinco minutos, refletindo a estimulação direta dos nociceptores.

Na segunda fase, com duração de 15 a 30 minutos após a estimulação, ocorre a liberação de agentes inflamatórios induzindo a dor (TJOLSEN, 1992).

A injeção intraplantar de formalina promoveu uma resposta característica bifásica (Tabela 6).

A duração do tempo de lambida na primeira fase (0-5 min) foi de  $76,12 \pm 2,81$  e na segunda fase (15-30 min) foi de  $82,50 \pm 2,77$  para o grupo controle. Após 60 minutos de tratamento, a dose de 400 mg/kg do óleo de gergelim inibiu a primeira fase em 29,90%.

As doses de 200 mg/kg e 400 mg/kg causaram diminuição significativa do tempo de lambida durante a segunda fase.

Como esperado, a morfina (1 mg/kg) foi ativa em ambas as fases. Assim, foi observado um efeito central e periférico através de uma resposta bifásica do tempo da lambida da pata induzida por formalina pelo óleo de gergelim.

**Tabela 6** Efeitos do óleo de Gergelim a partir nocicepção induzida por formalina em camundongos

Grupos	Doses (mg/kg)	Lambidas na pata			
		Primeira fase		Segunda fase	
		Média±E.P.M.	Inibição (%)	Média±E.P.M.	Inibição (%)
Controle	Salina	76,12±2,81	-	82,50±2,77	
	100	75,50±2,35	-	82,12±2,54	-
Óleo de gergelim	200	68,50±2,07*	10,01	71,37±2,03**	13,50
	400	53,37±2,13***	29,90	56,37±2,84***	31,67
Morfina	5	21,25±2,41***	72,08	25,87±1,86***	68,64
Indometacina	10	73,62±2,22	3,28	28,62±2,54***	65,00

Valores expressos em média  $\pm$  erro padrão da média (E.P.M.) para 8 camundongos. \*  $p < 0,05$ ; \*\*  $p < 0,01$ ; \*\*\*  $p < 0,001$  diferença significativa em relação ao grupo controle

## 5.8 Teste Da Placa Quente para o óleo de gergelim

No tempo zero, não houve efeito significativo quando comparado ao grupo controle. Na Tabela 7, é mostrado que a dose de 400 mg/kg aumentou o tempo de permanência ( $p < 0,001$ ) a partir de 30 minutos, enquanto a dose de 200 mg/kg teve efeito significativo após 90 minutos ( $p < 0,05$ ) de tratamento.

A naloxona, antagonista opióide, reduziu o efeito da morfina, mas não alterou o efeito analgésico do extrato testado ( $p < 0,01$ ).

O estímulo térmico do teste da placa quente é utilizado para avaliar a atividade analgésica mediada por mecanismos centrais (EDDY; LEIMBACH, 1953).

O óleo de gergelim aumentou o tempo de permanência dos animais na placa, sugerindo que esse óleo possui efeito analgésico central, já que o bloqueio das respostas na placa quente indica um mecanismo de ação no sistema nervoso central.

Contudo os resultados também sugeriram que a ação analgésica deste óleo não é exclusivamente dependente do sistema opióide, pois o tratamento com naloxona, antagonista opióide, não reverteu totalmente o efeito produzido.

**Tabela 7** Efeitos do óleo de gergelim sobre o tempo de latência de ratos expostos ao teste da placa quente

Grupo	Doses (mg/kg)	Tempo de reação			
		Tempo 0'	Tempo 30'	Tempo 60'	Tempo 90'
Controle	Salina	5,84±0,52	5,91±0,35	6,31±0,42	6,76±0,46
	100	5,86±0,49	6,25±0,44	6,71±0,38	7,07±0,36
Óleo de gergelim	200	5,78±0,59	6,40±0,47	7,75±0,33*	8,38±0,23**
	400	6,01±0,37	6,70±0,48	8,98±0,26***	10,51±0,48***
Morfina	5	5,98±0,48	9,57±0,49***	13,41±0,57***	16,56±0,82***
Naloxona+Morfina	1+5	5,87±0,37	8,61±0,37***	7,31±0,33	7,08±0,26
Naloxona+oleo de gergelim	1+400	5,80±0,52	6,52±0,45	8,04±0,29**	8,81±0,34**

Valores expressos em média  $\pm$  erro padrão da média para 8 camundongos. \*  $p < 0,05$ ; \*\*  $p < 0,01$ ; \*\*\*  $p < 0,001$  diferença significativa em relação ao grupo controle

## 5.9 Edema De Pata Induzido Por Carragenina para o óleo de gergelim

O efeito antiinflamatório do óleo de gergelim avaliado pelo método do edema de pata induzido por carragenina é mostrado na Tabela 8. A inibição do edema foi observada nas doses de 200 mg/kg e 400 mg/kg após três horas de teste em relação ao controle e o edema da pata tendo sido igual a partir da terceira hora para a dose de 400mg/Kg do óleo de gergelim em comparação com a indometacina.

O edema induzido por carragenina é um modelo bifásico, com vários mediadores atuando em seqüência para produzir a resposta inflamatória. Na fase inicial (0-1 h) ocorre liberação de histamina, serotonina e bradicinina. A fase posterior (1-4 h) está correlacionada com elevada produção de prostaglandinas, ativação da COX-2 na resposta inflamatória (WINTER, 1962). De acordo com os dados acima o óleo de gergelim parece atuar sobre a fase final da resposta inflamatória induzida por carragenina, inibindo a ciclooxygenase, reduzindo a biossíntese de prostaglandina.

**Tabela 8** Efeitos do óleo de gergelim sobre o edema de pata de rato induzido por carragenina

Grupos	Doses (mg/kg)	Volume do edema da pata (mL)			
		1 h	2 h	3 h	4 h
Controle	Saline	0,31±0,03	0,40±0,04	0,61±0,03	0,57±0,02
	100	0,31±0,02	0,39±0,03	0,59±0,02	0,52±0,03
Óleo de gergelim	200	0,30±0,03	0,38±0,03	0,52±0,03*	0,47±0,01**
	400	0,30±0,02	0,37±0,02	0,47±0,02***	0,41±0,01***
Indometacina	10	0,29±0,03	0,35±0,03	0,41±0,01***	0,39±0,02***

Valores expressos em média ± erro padrão da média para 6 ratos. \*  $p < 0,05$ ; \*\*  $p < 0,01$ ; \*\*\*  $p < 0,001$  diferença significativa em relação ao grupo controle

## 5. 10 Pleurisia Induzida Por Carragenina para o óleo de gergelim

Os efeitos sobre a pleurisia demonstraram que as doses testadas reduziram, significativamente, o volume do exsudato e o número de leucócitos totais (tabela 9). A redução do volume do foi observado para as doses de 200 e 400 mg/kg, em comparação a solução salina. A inibição da migração leucocitária ocorreu nas doses de 200 mg/kg e 400 mg/kg. Não houve diferença significativa entre polimorfonucleares e mononucleares em relação ao controle. A indometacina

reduziu o volume do exsudato e a migração leucocitária sendo que não houve diferença significativa com o óleo de gergelim nas doses de 200 mg/kg ( $p < 0,05$ ) e 400 mg/kg ( $p < 0,001$ ).

Este é um método bastante interessante, pois avalia o infiltrado e confirma os resultados obtidos no edema de pata causado pela carragenina. Os antiinflamatórios não-esteróides, tal como a indometacina, inibem o acúmulo do exsudato e a mobilização de leucócitos entre três e seis horas após aplicação da carragenina (COMPASSO *et al*, 1975).

Assim, o óleo de gergelim ao reduzir o volume do exsudato e a migração leucocitária corroborou com os resultados do edema de pata para proposição do mecanismo de ação antiinflamatória para o óleo de gergelim (Tabelas 8 e 9). O mecanismos de ação dos produtos que possuem ácidos graxos insaturados na inflamação e função endotelial estão relacionados à incorporação nos fosfolipídeos das membranas celulares do endotélio vascular, monócitos, macrófagos e adipócitos, alterando a função dos receptores específicos destas células e das vias de sinalização e transcrição (ADEL, 2011).

Sabe-se que o uso indiscriminado de antiinflamatórios não esteroide pela população é uma realidade, principalmente em países de baixa renda onde a população não tem acesso facilitado aos serviços de saúde. Muitos destes fármacos apresentam efeitos adversos como gastropatias e nefropatias, sendo assim interessante a avaliação do uso de produtos naturais que tenham ação antiinflamória caracterizada por menos efeitos colaterais (PIOTTO, 2009).

**Tabela 9** Efeitos do óleo de gergelim na exsudação pleural e no número de leucócitos no pleurisia induzida por carragenina em ratos.

Grupos	Doses (mg/kg)	Volume do exsudato(mL)	Nº Leucócitos ( $10^3$ células/mm <sup>3</sup> )
Controle	Saline	1,13 ± 0,08	13,07 ± 0,31
	100	1,07 ± 0,07	13,03 ± 0,36
Oleo de gergelim	200	0,88 ± 0,05*	10,67 ± 0,24***
	400	0,80 ± 0,06**	9,47 ± 0,44***
Indometacina	10	0,72 ± 0,04***	8,43 ± 0,30***

Valores expressos em média ± erro padrão da média para 6 ratos.  $p < 0,05$ ; \*\*  $p < 0,01$ ; \*\*\*  $p < 0,001$  diferença significativa em relação ao grupo grupo controle

### **5.11 Identificação dos compostos principais do Óleo de Gergelim por Cromatografia Gasosa acoplada em espectrometria de Massa – CG/EM (ADAMS, 2007).**

Os principais constituintes identificados por CG/EM (figura 14) do óleo de gergelim estudado estão descritos na tabela 10. Resultados semelhantes foram encontrados por Odabasi e Balaban (2002), mostrando que o constituinte em maior concentração no óleo de gergelim é o ácido oléico (41,51 %). O ácido oléico também é conhecido por ômega 9 é um ácido graxo de cadeia longa tendo 18 carbonos na sua estrutura. Por possuir uma dupla ligação entre os carbonos ele é chamado de ácido graxo insaturado (HU *et al*, 2006).

O Ácido hexadecanóico (25,96 %) também conhecido como ácido palmítico é um dos ácidos graxos saturados mais comuns; encontrado em animais e plantas, está presente na epiderme, no qual a protege e ajuda a evitar a sua desidratação (XU *et al*, 2005).

O 9,12- ácido Octadecadienoico (20,39%) ou ácido linoléico é um ácido graxo poli-insaturado com 18 carbonos e duas insaturações. É essencial na dieta humana, sendo precursor do ácido araquidônico. Ácido Octadecanóico (5,21%) ou ácido esteárico, é um ácido graxo saturado com 18 carbonos com função emulsificante e o Sesamin (4,87%) que é uma lignana com grande ação antioxidante (HU *et al*, 2006)

O óleo de gergelim é um dos óleos de maior estabilidade oxidativa devido à presença em sua composição de constituintes antioxidantes, principalmente o tocoferol, o sesamol e outras lignanas (MOHAMED e AWATIF, 1998; WERE *et al*, 2006; HU *et al*, 2006). Os ácidos graxos poli-insaturados como o ácido linoléico e ácido linolênico, quando metabolizados formam outros ácidos como ácido araquidônico, ácido eicosapentaenóico e ácido docosahexaenoico. Os mamíferos não são capazes de sintetizar o ácido linoléico e linolênico, com isso são considerados ácidos graxos essenciais (ADEL, 2011).

Diversos estudos têm demonstrado os efeitos benéficos do ácido graxos insaturados à saúde: no metabolismo lipídico, causando redução nos níveis plasmáticos dos triglicerídeos, colesterol total, ação vasodilatadora e possível ação na prevenção e/ou tratamento do câncer (mama, próstata e cólon), além da atividade antiinflamatória, pois ajudam a reduzir a síntese de derivados do ácido

araquidônico: prostaglandina, tromboxano, prostaciclina e leucotrieno. Portanto, há de se supor que a estes ácidos podem atenuar os efeitos do processo inflamatório, a partir da diminuição da síntese dos eicosanóides (MOHAMED e AWATIF, 1998,

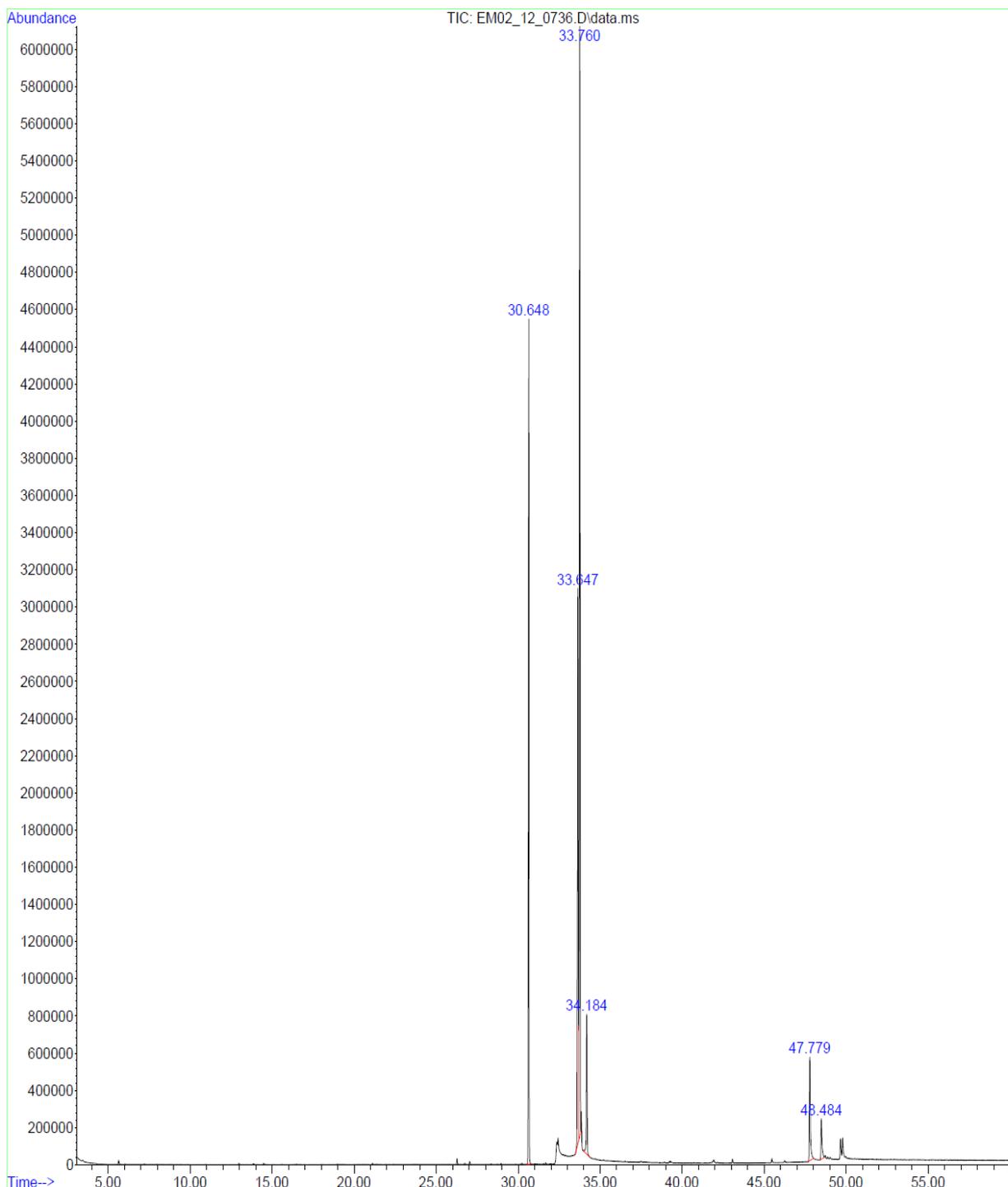


Figura 14: Cromatograma do óleo de gergelim amostra comercial realizado nas seguintes condições: HP-5 coluna (30 mx 0,25 mm de espessura de filme x 0,25 microns), hélio (1 mL / min), programado temperatura de 60 ° -240 ° C (3 ° C / min), temperatura do injetor (260 ° C) e uma interface (200 ° C); energia ionização, 70 eV, varredura de intervalo, 30-300 amu, tempo de varredura, 1 s

**Tabela 10** Principais componentes do óleo de gergelim em tempo de retenção na coluna HP-5 e concentração (%) dos constituintes.

Constituintes	Tempo de retenção	%	Método de identificação
Ácido hexadecanóico*	30.467	25,96	CG/EM
9,12- Ácido Octadecadienoico*	33.648	20,39	CG/EM
Ácido oléico*	33.760	41,51	CG/EM
Ácido Octadecanóico*	34.183	5,21	CG/EM
Sesamin*	47.777	4.87	CG/EM

\*Proposta de indentificação pelo banco de dados da biblioteca eletrônica Wiley 138.

### 5.12 Desenvolvimento de uma pré-formulação do enxaguatório bucal bifásico contendo extrato aquoso de *E. globulus* e óleo de gergelim.

Pelos resultados expostos, o extrato aquoso de *Mentha arvensis* não apresentou atividade antimicrobiana em relação à bactéria testada. Assim para propor o enxaguatório bucal não foi utilizado este extrato.

Foi proposto um enxaguatório bucal com 20% de óleo de gergelim 80% de extrato aquoso da diluição E1 (100 mg/mL) de *E. globulus*. Acrescido de 0,1 % de sacarina (edulcorante) e essência de 0,5% de essência *Mentha piperita*. (PRISTA *et al*, 2003).



Figura 15 Enxaguatório bucal bifásico proposto com 20 % de óleo de gergelim comercial e 80 % do extrato aquoso de *E.globulus* 100 mg/mL

## 6 CONCLUSÃO

De acordo com a metodologia empregada e os resultados obtidos pode-se concluir que:

- ✓ O extrato aquoso de *Mentha arvensis* não apresentou atividade antimicrobiana e antiaderente frente à cepa padrão de *S. mutans* ATCC 25175.
- ✓ O extrato aquoso de *E. globulus* foi positivo para a presença de taninos, flavonóides e saponinas. A apresentou atividade antimicrobiana frente a cepa de *Streptococcus mutans* ATCC 25175 observando um halo de  $20,0 \pm 0,66$  mm ( $p < 0,05$ ), a CIM e a CIMA foram determinadas na diluição E4 (12,5 mg/mL).
- ✓ O óleo de gergelim não apresentou halo de inibição no teste de difusão em Agar. Acredita-se que seja pelo fator da diluição do óleo, pois em meio líquido apresentou atividade. A sua CIM e CIMA foi a OG 3 (25%). O óleo de gergelim apresentou atividade antiinflamatória e antinociceptiva nos ensaios realizados, sendo dose dependente. No CG/EM deste óleo indicou a presença de ácidos graxos insaturados que já possuem atividades antiinflamatórias comprovadas.
- ✓ A pré-formulação de um enxaguatório bucal bifásico contendo extrato aquoso de *E.globulus* e óleo de gergelim proposta neste trabalho mostrou ter potencial antimicrobiano e antiaderente frente à cepa padrão de *S. mutans* ATCC 25175 e o óleo de gergelim indicou uma provável ação antiinflamatória e antinociceptiva.
- ✓ Mais estudos precisam ser desenvolvidos a fim de confirmar a eficácia destes extratos para e sua utilização como coadjuvante terapêutico na prevenção e tratamento das infecções bucais, já que estes possuem potencial para serem empregados como materias primas para formulação de enxaguatórios bucais.

## 7 SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

Considerando a nova abordagem que este trabalho representa, os resultados permitiram abrir novas propostas de trabalho, tais como:

- Executar os ensaio de atividade antimicrobiana e aderência microbiana para outros microrganismos, cujo controle do crescimento tenha aplicação terapêutica.
- Executar ensaios de aderência a nível celular e elucidar de forma minuciosa o mecanismo de impedir a aderência, por microscopia de varredura.
- Executar ensaio de ação antiinflamatória, antinociceptiva e toxicidade aguda para os extratos aquosos de *E. globulus*.
- Testar a estabilidade do enxaguatório bucal proposto.
- Testar o pH das substâncias utilizadas na formulação do enxaguatório bucal proposto

## REFERÊNCIAS

ADAMS, R.P. **Identification of Essential Oil Components by Gas Chromatography / Mass Spectrometry**, 4th Ed. Carol Stream, Illinois n.EditoraAllured Publishing Corporation. 2007.

ADEL, A. A. et al. Antioxidant potential of sesame (*Sesamum indicum*) cake extract in stabilization of sunflower and soybean oils. **Industrial Crops and Products**, Phoenix, v. 34, n. 1, p. 952-959, July 2011.

ANTOSHECHKIN, G. et al. Antoshechkin, A.G.; Golovkin, A.B.; Maximova, L.A.; Bakharev, V.A., Screening of amniotic fluid metabolites by gas chromatography-mass spectrometry, **Journal of Chromatographia**, v.1, n. 489, p. 353-358, 1989.

AHMAD, I.; BEG, A. Z. Antimicrobial and phytochemical studies on 45 INDIAN plants against multi-drug resistant human pathogens. **Journal Ethnopharmacology**, Amsterdam, v. 74, n. 2, p. 113-123, February 2001.

AL- AHMAD, A. et al. Food-borne enterococci integrate into oral biofilm: an *in vivo* study. **Journal of Endodontics**, Maryland, v. 36, n. 11, p. 1812-1819, 2010.

ALMEIDA, P. F. D. et al. Microbiota estreptocócica associada com a formação inicial da placa dental. **Revista de Ciências Médicas e Biológicas**, Salvador, v. 1, n. 1, p. 33-41, 2002.

ALVES, T. N. P. **Dispensação de medicamentos**: aspectos da realidade em Unidades Básicas de Juiz de Fora – MG 109f. Dissertação (Mestrado em Saúde Coletiva) – Universidade Estadual do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro. 2003

ANSEL, H. C.; POPOVICH N. G.; ALLEN L. V. **Farmacotécnica, Formas farmacêuticas e sistema de liberação de fármaco**. 6. ed. São Paulo: Premier, p. 568, 2000.

AWADALLA, H. I. et al. A pilot study of the role of green tea use on oral health. **International Journal of Dental Hygiene**, Oxford, v. 9, n. 2, p. 110-116, May 2001.

BATISH, D. R.; SINGH, H. P.; KOHLI, R. K.; KAUR, S. *Eucalyptus* essential oil as a natural pesticide. **Forest Ecology and Management**, Florida v. 256, p. 2166- 2174, 2008.

BERTINI, L. M. et al. Perfil de sensibilidade de bactérias frente a óleos essenciais de algumas plantas do nordeste do Brasil. **Infarma**, Brasília, v 17, n. 3-4, p. 80 – 83, 2005.

BIAVATTI, M. W.; LEITE, S.N. **Práticas de Farmacognosia**. 1. ed.:Itajai: Univale. 2000, 145 p..

BRASIL 1999. Congresso Nacional. Lei no. 9.782, de 26 de janeiro de 1999. **Define o Sistema Nacional de Vigilância Sanitária, cria a Agência Nacional de Vigilância Sanitária, e dá outras providências**. DOU. Poder Legislativo, Brasília, DF, 27 jan. 1999.

BRASIL 2004a. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Resolução de Diretoria Colegiada no. 48 de 16 de março de 2004**. Aprova o regulamento técnico de medicamentos fitoterápicos junto ao Sistema Nacional de Vigilância Sanitária. DOU. Diário Oficial da União, Poder Executivo, DF, Brasília, 18 mar. 2004.

BRASIL 2004b. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Resolução no. 88 de 16 de março de 2004**. Dispõe sobre a Lista de referências Bibliográficas para avaliação de segurança e eficácia de fitoterápicos. DOU. Poder Executivo, Brasília, DF, 18 mar. 2004.

BRASIL 2004c. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Resolução no. 89 de 16 de março de 2004**. Dispõe sobre a Lista de registro simplificado de fitoterápicos. DOU. Poder Executivo, Brasília, DF, 18 mar. 2004.

BRASIL 2004d. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Resolução no. 90 de 16 de março de 2004**. Dispõe sobre o Guia para os estudos de toxicidade de medicamentos fitoterápicos. DOU. Poder Executivo, Brasília, DF, 18 mar. 2004. Brasil 2004e. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução no. 91 de 16 de março de 2004. Dispõe sobre o Guia para realização de alterações, inclusões, notificações e cancelamento pós-registro de fitoterápicos. DOU. Poder Executivo, Brasília, DF, 18 mar. 2004

BRASIL 2010. Ministério da Saúde **Resolução RE nº 17 , de 16 de abril de 2010**. Dispõe das Boas Práticas para a Fabricação de Medicamentos. Diário Oficial [da] União, Poder Executivo, Brasília, DF, 16 abr. 2010.

BRETAS, L. P.; et al. Fluxo salivar e capacidade tamponante da saliva como indicadores de susceptibilidade à doença cárie. **Pesquisa Brasileira em Odontopediatria e Clínica Integrada**, João Pessoa, v. 8, n. 3, p. 289-293, 2008.

BROPHY, J.J.; I.A. SOUTHWELL. *Eucalyptus* chemistry, in *Eucalyptus: The Genus Eucalyptus*, **Journal Jonh Cooper**, London, p. 102-60, 2002.

BRUM, K. B. **Papel das saponinas e do *Pithomyces chartarum* como agentes hepatotóxicos para ruminantes em sistema de pastejo.** 93f. Tese (Doutorado em Ciência Animal) – Escola de Veterinária, Universidade Federal de Goiás, Goiânia, 2006

BUGNO, A. et al. Enxaguatórios bucais: avaliação da eficácia antimicrobiana de produtos comercialmente disponíveis. **Revista Instituto Adolfo Lutz**, São Paulo, v. 65, n. 1, p. 40-4, 2006.

CERMELLI, C. et al. Effect of Eucalyptus essential oil on respiratory bacteria and viruses. **Current Microbiology**. Germany, v. 56, p. 89-92, 2008.

CIMANGA K., et al. Correlation between chemical composition and antibacterial activity of essential oils of some aromatic medicinal plants growing in the Democratic Republic of Congo. **Journal of Ethnopharmacology** Leiden, v. 79, p. 213-220, 2002

CHAGAS, A.C.S.; PASSOS, W. M.; PRATES, H. T.; LEITE, R.C.; FURLONG, J.; FORTES, I.C.P. Efeito acaricida de óleos essenciais e concentrados emulsionáveis de *Eucalyptus sp* em *Boophilus microplus*. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, São Paulo, v. 39, n. 5, p. 247-253, 2002.

COLLIER, H. O.; DINNEEN, L. C; JOHNSON, C. A.; SCHNEIDER, C. The abdominal constriction response and its suppression by analgesic drugs in the mouse. **British Journal of Pharmacology and Chemotherapy**, v. 32, n. 2, p. 295-310, 1968.

COMPASSO F. et al. Further studies on carrageenan-induced pleurisy in rats. **Journal of Pathology**. United States, v. 116, p. 117-24, 1975

CRUZ, G.L. **Livro Verde de Plantas Mediciniais e Industriais do Brasil.**, 1ª Ed., Belo Horizonte, p. 462 – 463, 1965

CURY, J.A. et al. Effect of saccharin on antibacterial activity of chlorhexidine gel. **Brazilian Dental Journal**, Ribeirão Preto, v. 11, n. 1, p. 29-34, 2000  
DELASQUIS PJ, et al. Antimicrobial activity of individual and mixed fractions of dill, cilantro, coriander and eucalyptus essential oils. **International Journal of Food Microbiology**. Summerland, v.74: p.101-109, 2002

DIETRICH, L. A new approach to practical acute toxicity testing. **Archives of Toxicology**, v.54, n.4, p.275-287, 1983.

DEWHIRST, F. E. et al The Human Oral Microbiome. **Journal of Bacteriology**, Washington, v. 192, n. 19, p. 5002-2017, 2010.

EDDY, N. B.; LEIMBACH, D. Synthetic analgesics. II. Dithienylbutenyl and dithienylbutylamines. **Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, Stanford, v. 107, p. 385-393, 1953.

EMBRAPA. **Gergelim – Cultivo do gergelim**. Sistemas de Produção, Dez/2006  
Disponível em -  
<<http://sistemasdeproducao.cnptia.embrapa.br/FontesHTML/Gergelim/CultivodoGergelim/index.html> > Acesso em: 10 maio 2012.

ELGAYYAR, M. et al. Antimicrobial activity of essential oils from plants against selected pathogenic and saprophytic microorganisms. **Journal of Food Protection**. Des Moines, v.64, p.1019- 1024, 2001.

FARIAS, N. C. de; BUFFON, M.M.; CINI, R. Avaliação *in vitro* da ação antifúngica do digluconato de clorhexidina e nistatina no controle do crescimento de *Candida albicans*. **Visão Acadêmica**. Curitiba v. 4, n. 2, p. 83-88, jul-dez 2003.

Farmacopéia Brasileira 5ª ed., 2010.

FERGUSON, L. R. Role of plant polyphenols in genomic stability. **Mutation Research**. Auckland, v. 475, p. 89-111, 2001.

FRANCO, J. **Prospecção fitoquímica e análise química e microbiológica do óleo essencial de *Eucalyptus cinerea* F. Muell ex. Benth., Myrtaceae**, Dissertação, Mestrado em Ciências Farmacêuticas, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 71 p., 2005.

FREIRES, I. A. et al . Atividades antibacteriana e antiaderente in vitro de tinturas de *Schinus terebinthifolius* (Aroeira) e *Solidago microglossa* (Arnica) frente a bactérias formadoras do biofilme dentário. **Odontologia Clínico-Científica**. Recife, v. 9, n. 2, p 139-143, 2010 .

GARCIA, L. B. et al. Testes salivares e bacteriológicos para avaliação do risco de cárie. **Revista Brasileira de Análises Clínicas**, Rio de Janeiro, v. 41, n. 1, p. 69-76, 2009.

GHALEM B, MOHAMED B. Antibacterial activity of leaf essential oils of *Eucalyptus globulus* and *Eucalyptus camaldulensis* **African Journal of Pharmacy and Pharmacology**. Nigeria, v. 2, p. 211-215, 2008.

GROPPO FC, et al. Use of phytotherapy in dentistry. **Phytotherapy Research**. United States, v. 22(8), p.993-998, 2008.

HAMMER, K.A. et al. Antimicrobial activity of essential oils and other plant extracts. **Journal of Applied Microbiology**, United Kingdom, v. 86, p. 985–990, 1999.

HUNSKAAR, S.; HOLE, K. The formalin test in mice: dissociation between inflammatory and non-inflammatory pain. **Pain**, v. 30, n. 1, p. 103-114, 1987.

JANSSEN, et al. Antimicrobial activity of essential oils: a 1976-1986 literature review. Aspects of the tests methods. **Planta Medica**, Leiden, v,53, p. 395-398. 1987

KARTHIKEYAN, R. et al. Antimicrobial activity of nanoemulsion on cariogenic *Streptococcus mutans*. **Archives of oral biology**, Oxford, v 56(5), p. 437-445, 2011

KLEIN, M. I. **Transmissão, diversidade e estabilidade de genótipos de *Streptococcus mutans* e de *Streptococcus sobrinus***: estudo longitudinal em crianças. Dissertação de Mestrado Programa de Pós-Graduação em Biologia Bucodental – Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 77p., 2003.

KOSTER, R.; ANDERSON, M.; DE BEER, E. J. Acetic acid for analgesic screening. **Federation Proceedings**, v. 18, p. 412-416, 1959.

LEITES, A. C. B.; PINTO, M. B.; SOUSA, R. R. Aspectos microbiológicos da cárie dental. **Salusvita**, Bauru, v. 25, n. 2, p.135-148, 2006.

LIMA, E. O. et al Propriedades antibacterianas de óleos essenciais de plantas medicinais. **Revista Brasileira de Ciências da Saúde**, São Caetano do Sul, v. 7, p. 251-258, 2003.

LITCHFIELD, J. T.; WILCOXON, F. A. A simplified method of evaluating dose-effect experiments. **Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v. 96, n. 2, p. 99-113, 1949.

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

LUYO, A. G. P. Es la caries dental una enfermedad infecciosa y transmisible? **Revista Estomatologica Herediana**, Lima, v. 19, n. 2, p. 118-124, 2009.  
MOHAMED, H. M. A.; AWATIF, I. I. The use of sesame oil unsaponifiable matter as a natural antioxidant. **Food Chemistry**. Netherlands, v. 62, n. 3, p. 269-276, 1998.

MORETTO, E.; FETT, R. **Tecnologia de Óleos e Gorduras Vegetais na Indústria de Alimentos**. São Paulo Editora Varela, 1998, 150 p.

MAGAZZINI, L.; PAMMOLLI, F.; RICCABONI, M. Dynamic competition in pharmaceuticals. Patent expiry, generic penetration, and industry. **Europe Journal Health Economics**, Heidelberg, v. 5, p. 175-182, 2004

MINISTÉRIO DA SAÚDE. PROGRAMA NACIONAL DE PLANTAS MEDICINAIS E FITOTERÁPICOS. Disponível em:  
[http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/plantas\\_medicinais.pdf](http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/plantas_medicinais.pdf). Acesso em 14 de Julho de 2011.

MOHAMED, H. M. A.; AWATIF, I. I. The use of sesame oil unsaponifiable matter as a natural antioxidant. **Food Chemistry**. v. 62, n. 3, p. 269-276, 1998.

MOIMAS, S.A.S. et al. Educação para a saúde bucal e prevenção. **Revista Gaucha de Odontologia**, Campinas, v. 42, n. 2, p. 71-74, 1994.

MOREIRA, A.N., et al. Agentes antimicrobianos no controle da placa supragengival parte I. **Arquivos em Odontologia**. Brasil, v. 37(1), p.87-98, 2001

MOURA, J. K. D. et al. Avaliação quantitativa do fluxo salivar estimulado em crianças e adolescentes. **Revista Odonto Ciências**, Porto Alegre, v. 23, n. 4, p. 380-383, 2008.

NANAYAKKARA V.; EKANAYAKE L. Use of traditional medicine for oral conditions in rural Sri Lanka. **International Dental Journal**. United Kingdom, v.58(2):p. 86-90, 2008

NASCIMENTO, A. R., et al. Efeito inibitório do óleo essencial do *Eucalyptus sp.*, puro e associado a antibióticos, frente a cepas de *Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus* isoladas de manipuladores, alimentos, areia e água do mar. **Boletim do Centro de Pesquisa de Processamento de Alimentos**, Curitiba, v. 28, n. 1, p. 141-148, 2010.

NICOLETTI, A. M et al. Principais interações no uso de medicamentos fitoterápicos. **Infarma**, Brasília, v.19, nº 1/2, 2007.

ODABASI. A. Z.; BALABAN, M. O.; Supercritical CO<sub>2</sub> extraction of sesame oil from raw seeds. **Journal of Food Science and Thecnology**. v. 39, n. 5, p. 496-501, 2002.

OLIVEIRA, F. Q. et al. Espécies vegetais indicadas na odontologia. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, Curitiba, v. 17, n. 3, p. 466-476, setembro, 2007.

PAI, M. B. H. et al. Antifungal efficacy of *Punica granatum*, *Acacia nilotica*, *Cuminum cyminum* and *Foeniculum vulgare* on *Candida albicans*: an *in vitro* study. **Indian Journal of Dental Research**, Mumbai, v. 21, n. 3, p. 334-336, 2010.

PALOMBO, E. A. Traditional medicinal plant extracts and natural products with activity against oral bacteria: Potential application in the prevention and treatment of oral diseases. **Oxford journal**, Oxford, v. 1, p. 1-15, 2009.

PELZER, E. L. et al. Acute and chronic antiinflammatory effects of plant flavonoids. **IL Farmaco.**, San Luis, v. 53, p. 421-424, 1998.

PINTO, T.J.A.; KANEKO, T.M.; OHARA, M.T. **Controle biológico de qualidade de produtos farmacêuticos, correlatos e cosméticos**. 2. ed. São Paulo: Atheneu, 2003. p.37-44.

PIOTTO F.R.S.B. et al. Prevalência da dor e do uso de analgésicos e anti-inflamatórios na automedicação de pacientes atendidos no Pronto-Socorro Municipal de Taubaté. **Revista de Dor** v.10(4), p. 313-317,2009.

PORTO, V.M.C. **Saúde bucal e condições de vida: uma contribuição do estudo epidemiológico para a inserção de atenção à saúde bucal no SUS**. Dissertação de mestrado. Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, Faculdade de Medicina de Botucatu, 2002

PRISTA, L. N.; ALVES, A. C.; MORGADO, R. **Tecnologia Farmacêutica**. 6. ed. Lisboa: Fundação Calouste Gulbenkian, 2003, v. 9, 786 p.

RAJESWARA, B. R. Biomass and essential oil yields of commint (*Mentha arvensis* L., var. piperascens Malinvaud ex Holmes) planted in different months in semi-arid tropical climate. **Industrial crops and products**, Phoenix, v. 10, p. 107-113, 1999.

RAMESH B., SARAVANAN R., PUGALENDI, K.V.. Influence of sesame oil on blood glucose, lipid peroxidation, and antioxidant status in streptozotocin diabetic rats. **Journal Medical Food**, New Rochelle, v.8, p. 377-381, 2005

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

RUBIRA, I. R. F. et al. Pesquisa de bactérias bucais em amostras de placa subgingival de indivíduos com o periodonto normal e de portadores de periodontite através da técnica do "SLOT IMMUNOBLOT". **Revista Odontologia**, Universidade de São Paulo, v. 10, p. 181-187, 1996.

SARTORATTO, A. et al. Composition and antimicrobial activity of essential oils from aromatic plants used in Brazil. **Brazilian Journal of Microbiology**, São Paulo, v. 35, p. 275-280, 2004.

SHASANY, A. K et al. Positive correlation between menthol content and *in vitro* menthol tolerance in *Mentha arvensis* L., cultivars. **Journal Bioscience**. Uberlandia, v. 25, n. 3, p. 263-266, 2000.

SIMÕES, C. M. O. et al. **Farmacognosia da Planta ao Medicamento**. 5. ed. Florianópolis: Ed. UFSC, 2004, 1102 p.

SRIVASTAVA, R. K. et al. Characteristics of menthol mint *Mentha arvensis* cultivated on Industrial scale in the Indo-Gangetic plains. **Industrial Crops and Products**, Phoenix, v. 15, p. 189-198, 2002.

STAMFORD, T. C. et al. Parâmetros bioquímicos e microbiológicos e suas relações com a experiência de cárie em adolescentes saudáveis. **Revista Brasileira de Saúde Materno Infantil**, Recife, v. 5, n. 1, p. 71-76, 2005.

TAMBELINI, C. A. et al. Cárie dentária entre adolescentes e sua relação com o excesso de peso e fatores sociodemográficos em Londrina, PR, Brasil. **Revista Odonto Ciência**, Porto Alegre, v. 25, n. 3, p. 245-249, 2010.

THYLSTRUP, A.; FEJERKOV, O. Testes para determinar o risco de cárie. **Cariologia clínica**, 2. ed. São Paulo: Santos, 1994, Cap.16, p.333-353.

UNFER, B.; SALIBA, O. Avaliação do conhecimento popular e práticas cotidianas em saúde bucal. **Revista Saúde Pública**, São Paulo, v.34, n.2, p. 190-195, 2000.

UNITED STATES PHARMACOPEIA. 32<sup>a</sup> ed., Rockville: United States Pharmacopeial Convention, 2009.

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

VAN, D. T.. The management of inflammation in Periodontal Disease. **Journal of Periodontology**, Chicago, v. 79, p. 1601-1608, 2008.

VASCONSELOS, L. C. S. Et al. Concentração Inibitória, 2008a Mínima de Aderência do gel de *Punica granatum* Linn contra *S. mutans*, *S. mitis* e *C. albicans*. **Brazilian Dental Journal**, Ribeirão Preto, v. 17, n. 3, p. 223-227, 2006.

VINEGAR, R.; TRUAX, J.F.; SELPH, J.L. Some quantitative temporal characteristics of carrageenin induced pleurisy in the rat. Proceedings of the Society for **Experimental Biology and Medicine**, v. 143, p. 711-714, 1973.

WERE, A. A et al. Seed oil content and fatty acid composition in East African sesame (*Sesamum indicum* L.) accessions evaluated over 3 years. **Field Crops Research**, v. 97, p.254–260, 2006.

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 antiinflammatory drugs. Proceedings of the Society for **Experimental Biology Medicine**, v. 111, p. 544-547, 1962.

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

ZHU, X. et al Prevalence, phenotype, and genotype of *Enterococcus faecalis* isolated from saliva and root canals in patients with persistent apical periodontitis. **Journal of Endodontics**, Chicago, v. 36, n. 12, p. 1950-1955, 2010.

XU, J.; CHEN, S.; HU, Q. Antioxidant activity of brown pigment and extracts from black sesame seed (*Sesamum indicum L.*). **Food Chemistry**, v. 91, p. 79-83, 2005.