

UNIVERSIDADE FEDERAL DO MARANHÃO
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE
CURSO DE FARMÁCIA

FABRÍCIO LIMA LÉDA

**VERNIZ DE QUITOSANA INCORPORADO COM EXTRATO DE *Cymbopogon citratus*
(DC) STAPF.**

SÃO LUÍS
2019

FABRÍCIO LIMA LÉDA

**VERNIZ DE QUITOSANA INCORPORADO COM EXTRATO DE *Cymbopogon citratus*
(DC) STAPF.**

Monografia apresentada à Coordenação do Curso de Farmácia da Universidade Federal do Maranhão como requisito para obtenção de Título de Bacharel em Farmácia.

Orientador (a): Prof^ª. Dr^ª. Patrícia de Maria Silva Figueiredo

SÃO LUÍS
2019

Ficha gerada por meio do SIGAA/Biblioteca com dados fornecidos pelo(a) autor(a).
Núcleo Integrado de Bibliotecas/UFMA

Léda, Fabrício Lima.

Verniz de quitosana incorporada com extrato de
cymbopogon citratus DC STAPF / Fabrício Lima Léda. - 2019.
46 p.

Orientador(a): Patrícia de Maria Silva Figueiredo.
Curso de Farmácia, Universidade Federal do Maranhão,
São Luís, 2019.

1. Atividade antimicrobiana. 2. Biofilme cariogênico.
3. Verniz de quitosana. I. Figueiredo, Patrícia de Maria
Silva. II. Título.

FABRÍCIO LIMA LÉDA

**VERNIZ DE QUITOSANA INCORPORADO COM EXTRATO DE *Cymbopogon citratus*
(DC) STAPF.**

Monografia apresentada à Coordenação do Curso de Farmácia da Universidade Federal do Maranhão como requisito para obtenção de Título de Bacharel em Farmácia.

Orientador (a): Prof^a. Dr^a. Patrícia de Maria Silva Figueiredo

Aprovado em: ____ de _____ de ____

BANCA EXAMINADORA

Prof^a. Dr^a. Patrícia de Maria Silva Figueiredo
(Orientadora)

Prof^a Dr^a Luiza Helena de Araújo do Carmo
(Examinadora)

Prof^a Dr^a Luciana Salles Branco de Almeida
(Examinadora)

AGRADECIMENTOS

Agradecimentos aos meus pais, Maria Cleuma Lima Léda e José Ribamar Falcão Léda, e a todos os outros integrantes da família pelo incentivo a continuar persistente aos meus projetos de vida.

Aos membros ativos do Laboratório de Microbiologia Clínica, em especial José Ribamar de Castro Júnior e Andressa Sousa Silva pela paciência e apoio.

A toda equipe do Laboratório de estudos Avançados de medicamentos – LEAF, pelo suporte técnico.

Ao professor adjunto da UFMG, Dr. Marco Aurélio Benini Paschoal por ter cedido gentilmente os discos de hidroxiapatita.

À minha orientadora, Prof^a Dr^a Patrícia Figueiredo pela paciência, pelo despertar do censo crítico científico, pelas ideias construtivas e transformação pessoal obtidas pelo convívio.

À Deus e ao Universo por tudo dar certo de acordo com os esforços já realizados.

RESUMO

A presença do biofilme dental é um dos fatores predisponentes para a maioria das patologias bucais, envolvendo dentes e os tecidos adjacentes. Entende-se como biofilme cariogênico como a deposição de diversas populações de microrganismos residentes, suplementares e transitórios da microbiota bucal humana aderida à película adquirida do esmalte do elemento dental. Este trabalho destinou-se a desenvolver um verniz de quitosana capaz de controlar o biofilme dental e suas doenças relacionadas com potencial atividade antimicrobiana e capacidade de bloqueio de adesão bacteriana com auxílio da presença de extrato de *Cymbopogon citratus*. O verniz à base de quitosana foi desenvolvido de acordo com a adição de um solvente químico orgânico ou inorgânico, ou uma mistura deles, que fosse volátil e evaporem rapidamente, deixando os ativos sobre o esmalte dos dentes. Através do perfil fitoquímico do extrato identificou-se a presença de compostos fenólicos e saponinas fortemente positivos (+++). Foram feitas caracterização de secagem, pH, condutividade elétrica e controle de qualidade microbiológico. Apresentou atividade antimicrobiana significativa para *Streptococcus mutans* (CIM: 3,125 mg/mL), *Candida albicans* (CIM: 6,25 mg/ml), *Enterococcus faecalis* (CIM: 6,25 mg/mL), *Enterococcus spp.* (CIM: 6,25 mg/mL) e *Staphylococcus aureus* (CIM 6,25 mg/mL). O verniz de quitosana na presença ou na ausência de extrato têm capacidades semelhantes de impedir a adesão de *S. mutans* à superfície do esmalte dentário, pois estatisticamente, as porcentagens de adesão aos discos de hidroxiapatita encontraram-se valores aproximados de 40% em relação ao controle de adesão em uma concentração de 1.5625 mg/mL. O verniz de quitosana que apresentou as melhores condições para estudos posteriores *in vivo* apresentou tempo de secagem entre 10 a 12 minutos.

Palavras-chave: Biofilme cariogênico. Verniz de quitosana; Atividade antimicrobiana.

ABSTRACT

The presence of the dental biofilm is one of the predisposing factors for most oral pathologies, involving teeth and adjacent tissues. It is understood as a cariogenic biofilm as the deposition of several populations of resident, supplementary and transient microorganisms of the human oral microbiota adhered to the acquired dental enamel film. This work aimed to develop a varnish of chitosan capable of controlling the dental biofilm and its diseases related to potential antimicrobial activity and blocking ability of bacterial adhesion with the aid of the presence of extract of *Cymbopogon citratus*. Chitosan-based varnish was developed according to the addition of an organic or inorganic chemical solvent, or a mixture thereof, which is volatile and evaporates rapidly, leaving the active ingredients on the tooth enamel. Through the phytochemical profile of the extract, the presence of strongly positive phenolic compounds and saponins (++++) was identified. Drying, pH, electrical conductivity and microbiological quality control were performed. It showed significant antimicrobial activity for *Streptococcus mutans* (MIC: 3.125 mg / mL), *Candida albicans* (MIC: 6.25 mg / ml), *Enterococcus faecalis* (MIC: 6.25 mg / mL), *Enterococcus* spp. (MIC: 6.25 mg / mL) and *Staphylococcus aureus* (MIC 6.25 mg / mL). The chitosan varnish in the presence or absence of extract has similar abilities to prevent the adhesion of *S. mutans* to the surface of the dental enamel, because statistically, the percentages of adhesion to the hydroxyapatite discs were approximated values of 40% in relation to the adhesion control at a concentration of 1.5625 mg / mL. The chitosan varnish that presented the best conditions for later studies in vivo presented drying time between 10 and 12 minutes.

Keywords: Cariogenic Biofilm. Chitosan varnish; Antimicrobial activity.

LISTA DE FIGURAS

| | |
|---|----|
| Figura 1 - Estrutura molecular parcial da quitina e da quitosana | 12 |
| Figura 2 - Exemplar de <i>Cymbopogon citratus</i> (DC) stapf..... | 14 |
| Figura 3 - Etapas e operações para obtenção do extrato..... | 17 |
| Figura 4 - Etapas e operações para produção de verniz | 19 |
| Figura 5 - Verniz de quitosana G..... | 24 |
| Figura 6 - Verniz G base e incorporado com extrato seco de <i>C. citratus</i> | 28 |
| Figura 7 - Bloqueio de adesão bacteriana de <i>S. mutans</i> UA 159700610 em corpos de prova de hidroxiapatita na presença do verniz incorporado com extrato e do verniz base. | 32 |

LISTA DE TABELAS

| | |
|--|----|
| Tabela 1 - Análise fitoquímica do extrato hidroalcoólico de <i>C. citratus</i> (DC) Stapf. | 22 |
| Tabela 2 - Atividade antimicrobiana de extratos hidroalcoólicos de <i>C. citratus</i> na concentração inicial antes do primeiro poço de 50 mg/mL. | 25 |
| Tabela 3 - Atividade antimicrobiana de verniz incorporado com extrato de <i>C. citratus</i> com concentração antes do primeiro poço de 100mg/mL. | 26 |
| Tabela 4 - Características físico-químicas de verniz na ausência e na presença do extrato. | 30 |

LISTA DE QUADROS

| | |
|---|----|
| Quadro 1 - Componentes da formulação G de verniz de quitosana. | 24 |
| Quadro 2 - Relação de concentração de quitosana e tempo de secagem de verniz de incorporado com extrato vegetal. | 29 |
| Quadro 3 - Avaliação da qualidade microbiológica de formulação para verniz G. | 31 |

SUMÁRIO

| | |
|--|-----------|
| 1. INTRODUÇÃO | 9 |
| 1.1 Justificativa | 10 |
| 2. REVISÃO DE LITERATURA | 11 |
| 2.1 Biofilme dental: formação da cárie e outras doenças | 11 |
| 2.2 Vernizes odontológicos | 13 |
| 2.3 Propriedades da quitosana | 14 |
| 2.4 <i>Cymbopogon citratus</i> (DC) Stapf. | 15 |
| 3. OBJETIVOS | 18 |
| 3.1 Objetivo Geral | 18 |
| 3.2 Objetivos específicos | 18 |
| 4. MATERIAL E MÉTODOS | 19 |
| 4.1 Obtenção do extrato hidroalcoólico de <i>Cymbopogon citratus</i> (DC) Stapf. | 19 |
| 4.2 Estudo fitoquímico qualitativo do extrato | 20 |
| 4.3 Produção do verniz de quitosana | 20 |
| 4.4 Avaliação antimicrobiana <i>in vitro</i> de extrato e verniz | 21 |
| 4.5 Controle de qualidade físico-químico e microbiológico | 22 |
| 4.6 Teste de bloqueio de adesão bacteriana em discos de hidroxiapatita | 23 |
| 5. RESULTADOS E DISCUSSÕES | 23 |
| 5.1 Estudo fitoquímico de <i>Cymbopogon citratus</i> (DC) Stapf. | 24 |
| 5.2 Produção do verniz de quitosana | 25 |
| 5.3 Avaliação antimicrobiana de extrato de <i>Cymbopogon citratus</i> (DC) Stapf. e verniz de quitosana | 27 |
| 5.4 Controle de qualidade físico-químico e microbiológico | 30 |
| 5.4.1 Tempo de secagem | 30 |
| 5.4.2 Resultados para qualidade físico-química do verniz | 32 |
| 5.4.3 Resultados para controle de qualidade microbiológico | 32 |
| 5.5 Teste de bloqueio de adesão bacteriana em discos de hidroxiapatita | 33 |
| 6. CONCLUSÕES | 36 |
| REFERÊNCIAS | 35 |

1. INTRODUÇÃO

A presença do biofilme dental é um dos fatores predisponentes para a maioria das patologias bucais, envolvendo dentes e os tecidos adjacentes pertencentes à cavidade oral (ADDY et al., 1992). Entende-se como biofilme cariogênico como a deposição de diversas populações de microrganismos residentes, suplementares e transitórios da microbiota bucal humana aderida à película adquirida do esmalte do elemento dentário (OLIVEIRA et al, 2007).

Entre as espécies bacterianas participantes, a espécie *Streptococcus mutans* tem papel determinante na instalação desse biofilme, relacionando sua presença à etiologia da cárie dentária. Inúmeros estudos avaliaram a formação do biofilme dental utilizando *S. mutans* isolada para testar a eficácia de agentes antimicrobianos naturais e anticariogênicos (CARVALHO, 2018; SOARES, 2008). Assim como há deposição de microrganismos oportunistas que estão relacionados à outras patologias orais, tais como, infecções no canal radicular por *Enterococcus faecalis* (PECIULIENE et al., 2000) e *Candida albicans* (SIQUEIRA, 2004) que são constantemente isolados do biofilme dental (MURDOCH, et al., 2004; SMITH, et. al, 2003).

Com isso, De Luca (2011) e Strohmenger (2001) indicam que os antimicrobianos mais utilizados com atividade anticárie contra *Streptococcus mutans* são frequentemente utilizados nas mais variadas formas farmacêuticas, entre elas, dentifrícios, enxaguatórios, géis e vernizes. Dentre elas, os vernizes são capazes de formar uma película protetora enquanto seus componentes voláteis secam (FERREIRA, 2009) e quando utilizados para fins odontológicos permitem tempo prolongado dos ativos presentes em contato com a película adquirida (PESSAN, 2008).

O verniz dental mais utilizado em âmbito clínico contém flúor (Duraphat®, por exemplo), que tem seu principal efeito anticárie com atividade remineralizante sobre o esmalte, incluindo um importante, porém sutil, efeito antimicrobiano (MARSH, 1993). Há outra opção presente no mercado, tal como verniz dental de clorexidina 1%, porém o princípio ativo tem dificuldades de ser liberado de forma repetida com veículos que são capazes de formar uma película protetora (RIBEIRO, 2005). Desta forma, opta-se pela busca de alternativas para substituir antimicrobianos e anticariogênicos sintéticos que se alega provocar reações adversas orais como: alteração na coloração nos elementos dentários, perda do paladar, queimaduras no tecido mole, dor, xerostomia, lesões descamativas, ulcerações na mucosa e gosto residual desagradável na boca (ZANATTA FD, 2007).

Dentre os polissacarídeos naturais estudados em pesquisas de novos produtos encontra-se a quitosana, um polímero não tóxico, biocompatível e versátil quimicamente (THANOU et al, 2001). Suas propriedades permitem que este material seja utilizado em sistemas de liberação de drogas e produtos naturais em engenharia de tecidos, prometendo ser uma ferramenta nos cuidados com a saúde (ILLUM, 1998). Ao desenvolver novos medicamentos o uso de plantas medicinais pode ser utilizado como alternativas a compostos sintéticos. Entre elas, o *Cymbopogon citratus* (capim-limão) tem estudos comprobatórios sobre suas propriedades terapêuticas, pois muitos estudos já foram realizados, tanto com extratos como o óleo essencial, a fim de analisar o desempenho terapêutico, os quais identificaram a sua atividade antifúngica (HEYDER, SILVA, 2004), antibacteriana (ALVARENGA et al., 2007), antihelmíntica (ALMEIDA et al., 2003) e diurética (GÁLVEZ et al., 1998).

1.1 Justificativa

Sendo assim, a ideia do trabalho foi desenvolver uma forma farmacêutica capaz de incorporar extratos naturais para poder liberar de forma controlada os insumos ativos e que tenha melhor facilidade de adesão ao esmalte dentário. O produto é baseado em três grupos principais: insumo ativo, solvente e modificadores de viscosidade. Os ativos podem ser de origem natural, no caso deste trabalho, extrato de capim-limão. O solvente ou veículo foi pensado preferencialmente para ser orgânico e volátil. Já o polímero natural seria capaz de proporcionar um contato mais prolongado do ativo com a área de aplicação, assim como os modificadores de viscosidade.

Este estudo tem como maior importância avaliar a atividade antimicrobiana e a capacidade de bloqueio de adesão do biofilme dental relacionada ao extrato de *Cymbopogon citratus* (DC) Stapf. para o desenvolvimento de diferentes concentrações de uma forma farmacêutica desenvolvida e derivada do polímero natural em constituinte da parede resistente de alguns crustáceos, o verniz a base de quitosana. A ideia é utilizá-lo como alternativa aos produtos já existentes no mercado, que contém flúor e clorexidina, fazendo com ajude ao controle do biofilme dental, surgimento da cárie e outras doenças.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Biofilme dental: formação da cárie e outras doenças

Entende-se como cárie dentária quando ocorre um desequilíbrio na relação físico-química entre o biofilme cariogênico e o substrato dentário, o que resulta em deterioração da estrutura do órgão (MASKE et al., 2017). É considerada uma doença multifatorial que tem suas principais causas relacionadas à interação de fatores determinantes como dieta rica em sacarose, formação e deposição de biofilme dental e higiene bucal imprópria (CARVALHO, 2018). Atualmente, há uma especial ênfase dada aos aspectos comportamentais da doença e em especial ao hábito de consumo de carboidratos fermentáveis, o principal causador da doença cárie (SHEIHAN, 2015). Estudos demonstram que a incidência de cárie tem uma relação açúcar-dependente, podendo até diminuir com a redução do seu consumo (MOYNIHAN, 2016).

Entende-se que a primeira etapa de formação da cárie é pela colonização inicial de microrganismos que constituem o biofilme dental (MASKE et al., 2017). Sua formação é dependente de interações dos mesmos com o dente e dos microrganismos entre si e pode ser caracterizada por vários estágios arbitrários: formação da película adquirida, adesão às células bacterianas simples, crescimento de bactérias aderidas, formando microcolônias distintas, sucessão, co-agregação microbiana e comunidade clímax, que é o biofilme maduro (FEJERSKOV & KIDD, 2005). A espécie *Streptococcus mutans* são os microrganismos mais relacionados com a cárie dentária em humanos por possuírem a capacidade de colonizar os dentes, produzirem glucanos intra e extracelulares, serem altamente acidogênicos e acidúricos e metabolizarem várias glicoproteínas salivares (MALTZ, 1997), sendo responsáveis principalmente pela fase inicial da lesão. Já as espécies de *Lactobacillus spp.*, por não possuírem capacidade de aderência à superfície dentária, estão mais associados à progressão da lesão cariiosa, pois não são membros significantes da microbiota da placa bacteriana normal na ausência de cáries, mas são invasoras oportunistas que levam vantagem em condições de baixo pH estabelecidas por outra bactéria em lesões profundas de cárie. (VILLAVICENCIO, 2018).

Os microrganismos envolvidos na patogenia seguem seu desenvolvimento e progressão em sucessões microbianas autógenas nas camadas de esmalte, sendo verificada a detecção das principais espécies cariogênicas também em camada de dentina infectada. (TANIKAWA et al., 2007). Espécies como *Streptococcus oralis* e *Streptococcus salivarius* participam da formação inicial da placa dentária, e também contribuem para adequar o ambiente local à colonização do

microrganismo principal envolvido na etiologia, *Streptococcus mutans*, embora por não serem acidogênicos ou acidúricos, não atuam diretamente na desmineralização do esmalte dentário (ALVES et al., 2010).

Outros microrganismos podem estar associados a patologia oral e que interferem na formação de biofilme cariogênico, entre elas a espécie *Enterococcus faecalis* é potencialmente capaz de realizar a colonização e proliferação nas infecções dos canais radiculares, sendo bastante prevalente em periodontite apical pós-tratamento (PECIULIENE et al., 2000). Quando os microrganismos supracitados já estão instalados as chances de contaminação com fungos são maiores, pois com uma estrutura debilitada pode facilitar surgimento de infecções, principalmente nos canais radiculares de dentes endurecidos em que o tratamento falhou. Fungos leveduriformes como *Candida albicans* tem sido associada a casos de infecções persistentes nestes canais, pois a mesma pode ser resistente a alguns tratamentos intracanais (SIQUEIRA, 2004). Eles são capazes de produzir altas concentrações de ácidos (ácido láctico em maior proporção), polissacarídeos extracelulares e proteínas, e também para diminuir o pH da saliva suplementada com glicose até um valor de 3,2 por secretar ácidos orgânicos (BRIGHENTI et al., 2014), contribuindo para a cariogenicidade de biofilmes orais.

Segundo B. Kouidhi et al. (2010), a cárie dentária é sítio de ação formando por uma flora complexa, consistindo principalmente de colônias de estreptococos, pois o autor já investigou a ocorrência de *Staphylococcus aureus* por meio da técnica de PCR em eletroforese. Há inúmeros relatos de ocorrência desta bactéria da região oral (MURDOCH, et al., 2004; SMITH, et. al, 2003), incluindo raiz de lesões cariosas (ZARENBA, et al. 2006), mas nenhuma caracterização detalhada foi feita, sendo *S. aureus* não é o agente etiológico da formação de cárie ao contrário de estreptococos ou lactobacilos, mas sua presença na placa dentária é comprovada (DIDILESCU, 2005). Desta forma, há um interesse constante de identificar quais são os microrganismos principais associados ao biofilme cariogênico, assim como espécies oportunistas que vivem de forma comensal e se há alternativas de produtos naturais que possam combater esta associação.

2.2 Vernizes odontológicos

Pode-se dizer que um verniz odontológico é uma forma farmacêutica capaz de criar uma camada pelicular que permite a liberação dos fármacos na estrutura do esmalte dentário. Sua função é reduzir a população de microrganismos formadores do biofilme dental, por meio de liberação lenta, o que contribui para reduzir os efeitos da desmineralização do órgão causada pela cárie (PESSAN, 2008).

Neste conceito, as primeiras formulações a surgirem no mercado eram constituídas de ativos químicos antimicrobianos, tais como, vernizes de flúor que foram desenvolvidos e utilizados na terapêutica a partir da década de sessenta com o propósito de diminuir a incidência de cárie (CARVALHO, 2010). O flúor é um importante constituinte químico responsável pela remineralização da hidroxiapatita, pois atua como um auxiliar importante na manutenção do equilíbrio mineral dos dentes, inibindo a desmineralização, em consequência da formação de fluoreto de cálcio responsável pela reestruturação (SCHOLZ, 2016); MARINHO, 2013). Os vernizes foram originalmente desenvolvidos para prolongar o tempo de contato entre o flúor e o esmalte dentário, pois aderem à superfície dentária por períodos mais longos (12 horas ou mais) em uma camada fina e evitam a imediata perda de flúor após a aplicação. Sendo assim, essa aplicação permite formar reservatórios de liberação lenta de flúor tornando a toxicidade aguda menos provável (OGAARD, 1994).

As formulações são geralmente aplicadas com pequenas escovas, seringas ou pellets de algodão, usadas ou não como profilaxia prévia, em até quatro vezes no período de 12 meses. Eles são considerados seguros, apesar da alta concentração de flúor (em Duraphat®, por exemplo), pois a quantidade de verniz usualmente aplicada para tratar uma criança, por exemplo, é de apenas 0,5 ml em média (MARINHO et al., 2013; PETERSSON et al., 2004), com dose de 3 a 11 mg de fluoreto, o que reduz os potenciais efeitos adversos.

Posteriormente surgiram outras substâncias alternativas, dentre elas a clorexidina, pois descobriu-se que sua atividade bactericida se dá através da coagulação do citoplasma bacteriano, com posterior rompimento da membrana celular (VAN RIJKOM, 1996). Esse agente é considerado o "padrão-ouro", em comparação às demais substâncias desenvolvidas, por agir sobre a atividade metabólica dos microrganismos e bloqueando a ação da enzima glicosiltransferase que é responsável pela aderência das bactérias na superfície dental. Tem uma amplitude de espectro de ação maior em consideração a outros antimicrobianos, abrangendo bactérias Gram-positivas,

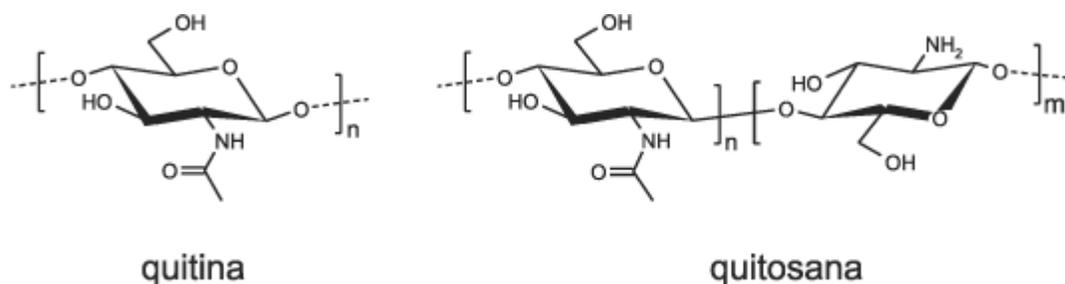
Gram-negativas e leveduras, além de seu efeito seletivo sobre o *Streptococcus mutans* (BOWEN, 1999; ROSA, 1993).

Apesar dos dois ativos, flúor e clorexidina, terem uma atividade antimicrobiana conhecida, há uma dificuldade de alto custo de comercialização no Brasil e uma escassez de produtos alternativos que possa baratear a produção. Isso torna o seu emprego oneroso na clínica odontológica e, conseqüentemente reflete no custo do atendimento que muitas vezes impede o paciente de usufruir dos benefícios deste produto. Sendo assim, o desenvolvimento de um verniz à base de quitosana contendo um extrato ativo vegetal como capim-limão, com efeito antimicrobiano comprovado cientificamente (LOU et al., 2017), pode suprir as necessidades de determinado público que não possa usufruir dos tratamentos já existentes.

2.3 Propriedades da quitosana

Os polissacarídeos naturais têm suas características que favorecem seu uso em estudos para buscar novos fins terapêuticos e medicinais, destacando-se a sua biodegradabilidade, biocompatibilidade e baixa toxicidade (ABREU, 2013). Dentre eles, a quitosana, um polissacarídeo obtido através da desacetilação da quitina, encontra-se presente no constituinte das paredes celulares do exoesqueleto de alguns insetos e crustáceos, como lagosta e caranguejo (SINHA, 2004). A quitina e quitosana (Figura 1) são copolímeros constituídos por unidades *N*-acetil-*D*-glicosamina e *D*-glicosamina em proporções variáveis, sendo que o primeiro tipo dessas unidades predomina no caso de quitina, enquanto quitosana é composta predominantemente, por unidades *D*-glicosamina (SILVA, 2006).

Figura 1. Estrutura molecular parcial da quitina e da quitosana.



Fonte: Silva, 2006

O potencial de aplicação da quitosana, o principal derivado da quitina, é multidimensional, passando desde aplicações na área alimentícia como em nutrição, biotecnologia, ciência dos materiais, drogas e produtos farmacêuticos, agricultura e proteção ambiental, e recentemente na terapia genética também (AZEVEDO et al., 2007). Segundo Oliveira (2004), a quitosana tem sua atividade antimicrobiana e antifúngica, além de suas propriedades biodegradáveis e biocompatíveis. A ação antimicrobiana deve-se ao fato da estrutura molecular ter predominância de cargas positivas, que interage com as cargas negativas da parede celular bacteriana, destrói os constituintes intracelulares e a permeabilidade de sua membrana. Sua propriedade de aderência as paredes da estrutura oral facilitam a liberação dos fármacos servindo como alvo terapêutico (DECKER et al., 2005).

A aderência da quitosana está relacionada tanto aos cristais de hidroxiapatita como à parede celular bacteriana, inibindo a adsorção dos microrganismos do grupo *Streptococcus spp.* à hidroxiapatita, conferindo-lhe ação bacteriostática (SHIBASAKI et al, 1995). Além disso, ela tem uma forte tendência de se adsorver a película adquirida, o que impede a colonização bacteriana na superfície dentária e, conseqüentemente a formação do biofilme dental cariogênico (VAN DER MEI et al, 2007).

Um estudo piloto demonstra que a utilização de quitosana pura, e quitosana associada a clorexidina tiveram efeitos sensíveis as amostras de saliva (OLIVEIRA, 2004), que contém a microbiota oral, e também demonstraram sensibilidade específica ao *S. mutans*. Fatores como pH, concentração e tempo foram diretamente proporcionais ao aumento dos parâmetros testados, desta forma a associação corrobora que os efeitos da quitosana pode potencializar a ação antimicrobiana de outros ativos terapêuticos.

2.4 Cymbopogon citratus (DC) Stapf.

A espécie *Cymbopogon citratus* (DC.) Stapf (Figura 2), descrito inicialmente como *Andropogon citratus* por De Candolle e re-classificado por Otto Stapf, pertence à Poaceae, uma das maiores famílias de plantas que engloba cerca de 500 gêneros e aproximadamente 8.000 espécies essencialmente herbáceas, denominadas genericamente de gramíneas. O gênero *Cymbopogon* inclui cerca de 30 espécies de gramíneas perenes aromáticas, sendo a maioria destas nativas da região tropical do Velho Mundo (GOMES & NEGRELLE, 2015). O nome deste gênero, *Cymbopogon*, deriva de *kymbe* (barco) e *pogon* (barba) em referência ao arranjo da sua

inflorescência (espiga) (PLANTS, 2008). Segundo Ribeiro & Diniz (2008), é uma erva originária da Índia, mais conhecida como capim-limão na medicina popular, onde é empregada especialmente como chá.

Figura 2. Exemplar de *Cymbopogon citratus* (DC) Stapf.



Fonte: Ferro, 2008

Em relação a sua morfologia as folhas são classificadas como longas (até 1,5 m de comprimento) e lanceoladas, de coloração verdepálida, cortante ao tato quando dilacerada manualmente. Suas epidermes em secção paradérmica, apresentam células de paredes espessas e onduladas com formatos alongados, os estômatos possuem células oclusivas em “halteres” e os tricomas tectores são unicelulares, curtos (50 μ m) e curvos, constituindo aspecto de “serra”. Em secção transversal do limbo foliar, evidencia-se mesófilo homogêneo lacunoso e bainhas de feixe esclerenquimáticas. O feixe vascular é do tipo colateral fechado. Dentre as inclusões celulares, destacam-se o óleo essencial nas células parenquimáticas e o amido no parênquima do mesófilo. As Fibras e células possuem paredes pontuadas (FERRO et al.,1996).

É uma planta aromática cultivada para a produção comercial de óleo essencial, que geralmente tem como constituintes principais em suas folhas jovens substâncias do grupo dos monoterpenos: Citral (65-86%), que é formado por uma mistura de geranial (α -citral) e neral (β -citral), contendo ainda cintronelal (7-8%). Dentre os compostos químicos presentes no óleo essencial, em especial o citral é o responsável, não só pelo odor de limão característico da planta, mas também por grande parte das atividades farmacológicas de *C. citratus*, tais como:

antiespasmódica, antiasmática, antibacteriana e antifúngica, além de poder ser ativo contra um amplo espectro de espécies de microrganismos. (BRITO 2013; BRUM, 2012; PRINS et al., 2008).

Diante disso, Lucena et al. (2015), destaca a importância de utilização dos componentes isolados do óleo essencial para reforçar seu uso com antimicrobianos aminoglicosídeos, pois é uma fonte alternativa de produto natural com ação antibacteriana, já que possui a presença de compostos com reconhecida atividade como terpenos, além de indicar a possibilidade do uso desse óleo combinado a antibióticos utilizados na clínica frente a linhagens de bactérias Gram-positivas e Gram-negativas. Em outro estudo Schuck et al. (2001) avaliaram a atividade antibacteriana e antifúngica do óleo volátil, extratos aquosos e hidroetanólico de *Cymbopogon citratus* frente a *Staphylococcus aureus*. Os resultados obtidos demonstraram que o óleo volátil apresentou atividade contra todos os micro-organismos testados.

Almeida et al., (2008) relata em seu estudo a atividade em microrganismos na cavidade oral principalmente relacionadas a candidose oral, pois apresentou atividade fungistática para todas as espécies de *Candida spp.* estudadas, sendo esse efeito maior para as cepas de *C. albicans* e *C. tropicalis*. O óleo essencial de *Cymbopogon citratus* (DC.) Stapf exibiu atividade fungicida para todas as espécies de *Candida* analisadas, com maior efeito sobre *C. albicans* e *C. krusei*. É importante avaliar estes resultados, pois são espécies comensais e oportunistas relacionadas a contaminação radicular do dente (SIQUEIRA, 2004).

Embora haja mais estudos relacionados ao óleo essencial de capim-limão, abre-se um leque vago em relação ao extrato, pois há poucos relatos científicos restringindo a atividade antifúngica (ALMEIDA et al. 2008) ou sua atividade antimicrobiana a *S. aureus* (MENEZES, et al.. 2009). Desta forma é necessária a investigação de novos veículos que possam carregar extratos de *C. citratus* para um possível controle do biofilme cariogênico.

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo Geral

Desenvolver verniz de quitosana para utilização no tratamento do biofilme dental e doenças relacionadas incorporado com extrato de *Cymbopogon citratus* (DC) Stapf. com potencial atividade antimicrobiana.

3.2 Objetivos específicos

a) Sintetizar formulações de verniz de quitosana capaz de incorporar extrato ativo de *Cymbopogon citratus*.

b) Obter extrato hidroalcoólico e análise fitoquímica de *Cymbopogon citraus* (DC) Stapf. para identificar os grupos metabólicos com potencial antimicrobiano.

c) Avaliar *in vitro* a atividade antimicrobiana de verniz de quitosana contendo *Cymbopogon citratus*, em uma única concentração, sobre microrganismos da microbiota oral e oportunistas;

d) Analisar a capacidade do verniz experimental de bloquear a adesão bacteriana *in vitro* a discos com estrutura de hidroxiapatita.

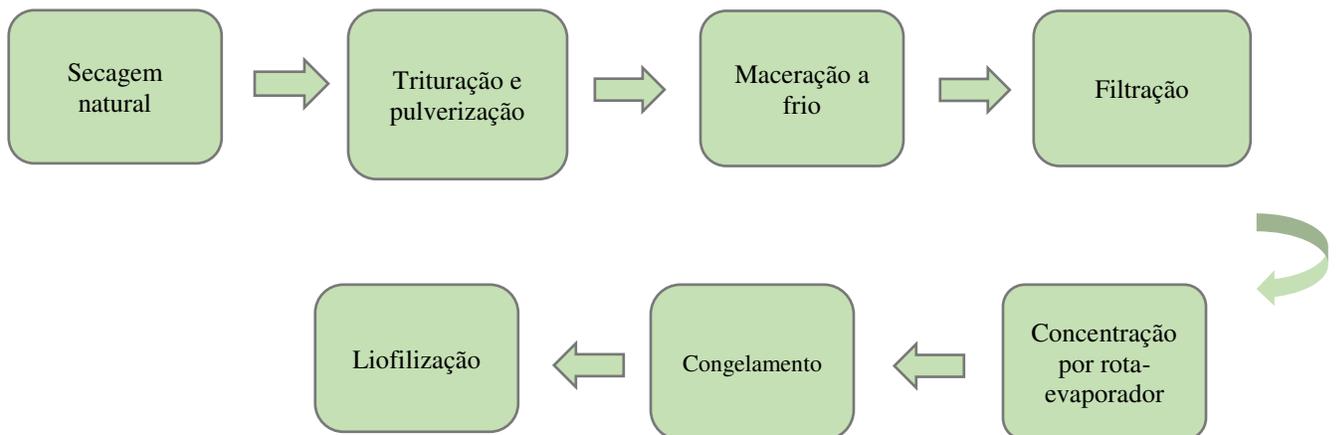
4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Obtenção do extrato hidroalcoólico de *Cymbopogon citratus* (DC) Stapf.

Primeiramente as folhas de *Cymbopogon citratus* foram colhidas no Horto Medicinal “Berta Lange de Morretes” no Herbário “Ático Seabra” da Universidade Federal do Maranhão-UFMA (Brasil) (S: 2°33’14” e W: 44°18’21”) e enviadas ao respectivo Herbário, para identificá-las e catalogá-las sob exsicata de número 00537.

O extrato hidroalcoólico foi obtido, segundo a metodologia proposta por Matos (2009), a partir das folhas de *Cymbopogon citratus* (DC.) Stapf após secagem natural durante 72 horas e trituração em pulverizador. Submeteu-se o pó ao processo de extração por esgotamento pelo método de maceração a frio utilizando solvente hidroetanólico 70% na proporção droga/solvente de 1:3, por cinco dias, com renovação de solvente a cada 24 horas. O extrato obtido foi concentrado em rota-evaporador (Modelo Ika-Werk), a uma temperatura constante de 45° C com 60 rpm de rotação. Depois de concentrado, foi congelado e liofilizado para facilitar a incorporação e diluição no produto. As etapas de obtenção do extrato hidroalcoólico estão esquematizadas na figura 3.

Figura 3. Etapas e operações para obtenção do extrato.



Fonte: Matos (2009)

4.2 Estudo fitoquímico qualitativo do extrato

O extrato vegetal hidroalcoólico de *Cymbopogon citratus* (DC) Stapf foi submetido a testes fitoquímicos qualitativos e semi-quantitativos, em triplicata, com finalidade de detectar a presença de classes de metabólitos secundários segundo a metodologia de Matos (2009). Os resultados para os metabólitos encontrados são classificados em: Negativo (-), Positivo (+), moderadamente positivo (++) e fortemente positivo (+++).

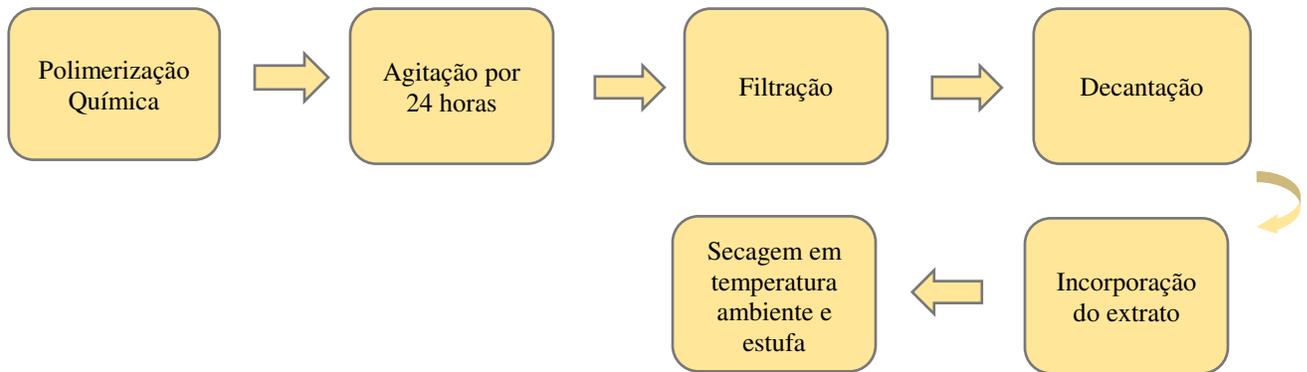
4.3 Produção do verniz de quitosana

A idealização da formulação baseou-se na adaptação, segundo Oliveira (2010) e De Luca (2011), que consiste na adição de um solvente químico orgânico ou inorgânico, ou uma mistura deles, que seja volátil e evapore rapidamente, deixando os ativos sobre o esmalte dos dentes. Com isso, pesou-se os componentes para a formulação alterando, gradativamente, as concentrações do polímero natural. Diluiu-se a quitosana já extraída em pedido de uma farmácia de manipulação (variando de 1% a 10%), em ácido orgânico fraco (ácido acético), variando as concentrações de 0,5% a 2% e água destilada estéril, formando uma solução etanólica ácida.

Adicionaram-se plastificantes químicos, entre eles a glicerina (concentrações de 1% a 3%). As formulações foram agitadas por 24 h, em agitador magnético, para homogeneização. Depois de 24h de agitação filtrou-se os componentes insolúveis do produto por meio de papel filtro e gaze em funil e béquer. Esperou-se estabilidade da fórmula em até 24 horas para a deposição de sedimentos e verificar se há formação de bolhas. Utilizou-se o extrato hidroalcoólico de *Cymbopogon citratus* esterilizado em filtro de 22 µm de membrana PES (Polietersulfona). A partir disto, dilui-se o extrato em uma alíquota do produto, de acordo com o cálculo da concentração desejada, e posteriormente adicionados ao volume inteiro. A obtenção do verniz está esquematizada na figura 4.

Depois de filtradas e incorporadas com extrato as amostras foram gotejadas e/ou pinceladas em placas de petri ou lâminas de vidro e esperou-se secar em temperatura ambiente, assim como secagem em estufa de circulação de ar em 37°C para a secagem. Os materiais viscosos resultantes foram secos em placa de Petri e lâminas de vidro.

Figura 4. Etapas e operações para produção do verniz.



Fonte: Oliveira (2010); De Luca (2011); Autor (2019)

4.4 Avaliação antimicrobiana de extrato de *Cymbopogon citratus* e verniz de quitosana

Para os testes de sensibilidade antimicrobiana foi utilizado o método de microdiluição em caldo Mueller-Hinton para descobrir o título responsável pela CIM (Concentração inibitória mínima) capaz de impedir o crescimento da carga microbiana das seguintes espécies: *Streptococcus mutans* ATCC 700610, *Candida albicans* ATCC 14053, *Candida Albicans* IC, *Enterococcus faecalis* ATCC 29212, *Enterococcus* IC, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 e *Staphylococcus aureus* IC. As diluições foram feitas em triplicata separando os microrganismos de teste de acordo com a avaliação da atividade do extrato hidroalcolólico de *Cymbopogon citratus* e o verniz incorporado com extrato.

Por meio de uma concentração inicial da solução-mãe, no caso o produto finalizado com o extrato incorporado, realizou-se sucessivas diluições nas placas de 96 poços em formato de “U” e descobriu-se qual concentração capaz de inibir o crescimento bacteriano e fúngico. A concentração inicial da solução-mãe hidroalcolólica do extrato foi de 50 mg/mL e a concentração de extrato no verniz de quitosana foi de 100 mg/mL. A partir daí diluiu-se o inóculo ajustado em solução salina até 15 minutos após sua preparação, de maneira que, após a inoculação, cada tubo de ensaio ou poço continha aproximadamente 5×10^5 UFC/mL de cada microrganismo testado ou até a turbidez de 0,5 em uma solução padrão da escala McFarland (CLSI, 2009).

Revelou-se com 20 μ L de Resazurina 0,01% para identificar o valor do título da CIM. Em seguida foram feitas semeaduras para CBM (Concentração bactericida mínima) tanto para bactérias e CFM (Concentração fungicida mínima) para leveduras. O tempo de revelação para bactérias foi

de 3 a 4 horas e para leveduras 4 a 6 horas. Como validação dos resultados utilizou-se os controles positivo com Clorexidina 0,12% para bactérias e fungos e controle negativo verniz base sem extrato e álcool 50%. Para controle crescimento diluiu-se o inóculo ao meio de cultura. Todos os testes foram realizados em triplicata.

4.5 Controle de qualidade físico-químico e microbiológico

Os testes de qualidade foram baseados segundo Ferreira (2009) que determina os parâmetros de qualidade para vernizes e RDC nº 67, de 8 de outubro de 2007 (ANVISA, 2007) que determina o controle de qualidade de matérias-primas de produtos magistrais. Os testes de qualidade foram avaliados os seguintes parâmetros: Peso/Volume, pH (aplicável devido a formulação conter água), densidade, cor, transparência (limpeza), propriedades reológicas (fluidez) e observações físicas (alteração de cor, presença de materiais estranhos, formação de gás e crescimento de bolor).

Foram realizados testes de controle de qualidade microbiológico nos produtos para saber se o extrato e o produto finalizado estavam contaminados e também para garantir a estabilidade da carga microbiana do produto com a necessidade de adição de conservantes. Os ensaios foram realizados no Laboratório de Microbiologia Clínica do curso de Farmácia, da Universidade Federal do Maranhão. As técnicas utilizadas foram dos tubos múltiplos, plaqueamento em profundidade (Pour Plate) e de superfície (Spread Plate).

Para avaliação de presença ou ausência de coliformes totais, termotolerantes e mesófilos totais, foram diluídas 1mL em 9 ml de solução de cloreto de sódio 9% (solução salina), sendo uma proporção de 1:10. Em seguida, pipetou-se alíquotas de 1 ml das respectivas diluições da amostra para uma série de 3 tubos de ensaio contendo 9ml do caldo verde brilhante estéril, Caldo Lauryl sulfato e caldo EC. Em seguida, foi feita a repetição deste processo por duas vezes com a mesma proporção para formar amostras em triplicata. Para análise dos resultados de coliformes fecais e coliformes totais, dentro de um período de 24 a 48 h de incubação à temperatura de 35°C a 37°C, para os caldos Lauryl e Verde brilhante e 44,5°C para o caldo EC. O mesmo foi feito para diluir o extrato. Transcorrido o tempo, observou-se se houve turvação e produção de gás nos tubos de Durham (APHA, 2005).

Conforme a metodologia expressa na Farmacopeia Brasileira 5ªEd. (2010), foi vertido sobre três placas de Petri estéreis uma alíquota de 1 ml da amostra do produto com auxílio de uma

pipeta estéril. Em seguida foram vertidos sobre a amostra aproximadamente Ágar padrão de contagem, liquefeito e já esterilizado, sobre cada placa, seguido de homogeneização. Em outras três placas estéreis verteu-se Ágar Sabouraud-dextrose para a contagem de fungos e bolores. Pipetou-se 100 µL do verniz na placa já solidificada e semeou-se com a alça de Drigalsky. Todas as placas foram identificadas e incubadas em estufa durante 4 dias de inoculação a 30-37 °C, para bactérias e 7 dias a 20- 25°C para fungos e depois decorrido o tempo analisar a turvação dos caldos e crescimento de colônias nas placas (FARMACOPEIA BRASILEIRA, 2010).

4.6 Teste de bloqueio de adesão bacteriana em discos de hidroxiapatita

Em uma placa de cultura contendo 24 poços transferiu-se uma alíquota de 1mL de Caldo Mueller Hinton enriquecido com 1% de glicose e 100µL cada suspensão microbiana de *Streptococcus mutans* padronizada na escala 0,5 na escala Mac Farland para cada orifício contendo um disco de hidroxiapatita impregnado com o verniz de quitosana incorporado com o extrato das folhas de *Cymbopogon citratus* na concentração de 1,5625 mg/mL, um valor abaixo da menor concentração inibitória mínima (CIM) de todos os extratos, assim como foram impregnados apenas a base do verniz em cada disco e incubadas em estufa de CO₂ (5%) a 37°C. Esta placa foi levada a estufa em uma jarra bacteriológica a 37°C e mantida por 8 horas (fase de adesão) (CHANDRA, 2001).

Para a análise quantitativa, os discos foram transferidos para tubos contendo 1 mL de PBS com glicose e submetidos a banho ultrassom usando três pulsos de 15 segundos a uma potência de 6 W, com intervalo de 15 segundos. Feito isso, mensurou-se a quantidade de microrganismos aderidos aos discos por meio do ensaio de MTT [3-(4,5-dimetiltiazol-2yl) -2,5-difenil tetrazolium], transferindo 1ml da suspensão homogeneizada para uma placa de 24 poços para o ensaio (RÊGO et al, 2016). Foram adicionados 20µL de solução MTT (5mg/ml) em cada poço. Incubou-se a placa no escuro por mais 3h a 37 °C em jarra bacteriológica, o conteúdo da placa foi descartado e procedeu-se à aplicação de 150 µL de DMSO por 15 min. Transferiu-se para uma placa de 96 poços para a leitura em espectrofotômetro Elisa a 540 nanômetros (FREIMOSER, 1999). Os dados foram analisados pelo teste T no programa Prism Graphpad 5 com um valor de P a 5% de confiança para diferenças estatisticamente significativas. Denominou-se controle de adesão o crescimento bacteriano nos discos de hidroxiapatita imersos no meio de cultura.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Estudo fitoquímico de *Cymbopogon citratus* (DC) Stapf.

O extrato hidroalcoólico de *Cymbopogon citratus* (DC) Stapf. foi obtido após processo de maceração e rotoevaporação, e sua concentração através do peso seco da alíquota de 1mL com concentração final de 153 mg/mL.

A prospecção química de extratos ativos naturais tem por importância imediata o esclarecimento e registro dos constituintes resultantes do metabolismo secundário dos seres vivos fotossintetizantes (MATOS, 1997). A análise fitoquímica do extrato hidroalcoólico de *C. citratus* (DC) Stapf identificou a presença de metabólitos como fenóis e saponinas classificados como fortemente positivo, taninos condensados, flavonas e cumarinas classificados como moderadamente positivo, assim como catequinas e alcalóides como positivos. Os valores estão conforme mostrados na Tabela 1:

Tabela 1. Análise fitoquímica do extrato hidroalcoólico de *C. citratus* (DC) Stapf.

| Metabólitos secundários | Classificação | Classificação |
|-------------------------|---------------|-------------------------|
| Fenóis | (+++) | Fortemente positivo |
| Saponinas | (+++) | Fortemente positivo |
| Taninos condensados | (++) | Moderadamente positivo |
| Flavonas | (++) | Moderadamente positivo |
| Cumarinas | (++) | Moderadamente positivos |
| Catequinas | (+) | Positivo |
| Alcalóides | (+) | Positivo |

Fonte: Autor (2019).

Os compostos fenólicos são os principais metabólitos secundários encontrados no extrato hidroalcoólico de *Cymbopogon citratus* (DC) Stapf. e tiveram valores significantes na análise. Para Souza et al. (2007), os grupos de compostos fenólicos das plantas enquadram-se em diversas categorias, como fenóis simples, ácidos fenólicos (derivados do ácido benzóico e cinâmico), cumarinas, flavonóides, estilbenos, taninos condensados e hidrolisáveis, lignanas e ligninas. Esses

compostos possuem um anel aromático com um ou mais substituintes hidroxílicos, incluindo seus grupos funcionais pois, suas características químicas são eficazes pela atividade antimicrobiana descritas por Castro (2007), relacionado a sazonalidade e quantidade de bioativos fenólicos e flavonoides pela quantidade produzida nos vegetais. Dentre os grupos encontrados que se enquadram como fenóis, com uma quantidade moderada, destacam-se, os taninos, mais especificamente os taninos condensados. Esses metabólitos apresentam propriedade antimicrobiana, antifúngica, anti-helmíntica, além de várias outras propriedades fisiológicas no organismo humano (FREITAS et al., 2018; FARIA et al., 2015).

Os valores expostos neste trabalho corroboram com os presentes nos estudos de Souza et al. (2015) os quais detectaram quatro classes de flavonoides: Antraquinonas, Flavonóis, Flavonas e Xantonas. Identificou-se a presença fortemente de saponinas, principalmente pela formação de espuma abundante e persistente, o que reforça o potencial farmacológico da planta em estudo, pois substâncias dessa classe, possuem propriedades anti-inflamatórias, larvicidas, hipocolesterolemiantes, expectorantes, ventrópicas e cicatrizantes (PELAH, 2002). Destes resultados tem-se a perspectiva de identificar quais grupos de compostos naturais tem sua efetividade na atividade antimicrobiana e posteriormente realizar o isolamento dos compostos ativos dos compostos químicos ativos.

5.2 Produção do verniz de quitosana

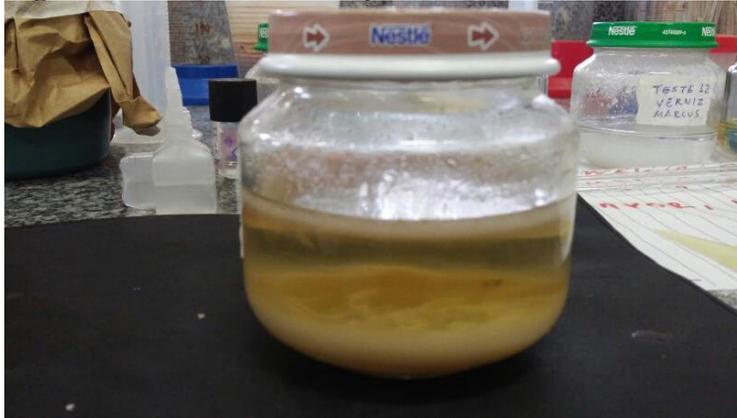
Seguiu-se o desenvolvimento de várias tentativas para chegar em uma formulação de verniz adequada para incorporação do extrato de *Cymbopogon citratus*. As formulações-testes variaram de acordo com a concentração e o tipo de componente presente em cada fórmula, como ausência ou presença de glicerina e álcool etílico. Os vernizes foram identificados de A a H pela quantidade de formulas testadas. Apenas dois vernizes tiveram resultados promissores com alguma viscosidade e maior chance de secagem na estufa ou em temperatura ambiente sem sedimentação, tais como vernizes F e G. Já os vernizes A, D e E apresentaram aspecto ressecado e quebradiço com possibilidades inviáveis de continuação da avaliação científica.

Os vernizes de formulação elaborados com a metodologia De Luca (2011) tiveram menor tempo de secagem sem precisar de estufa com circulação de ar ou temperaturas elevadas, pois os testes foram postos em lâminas de vidro em temperatura ambiente com formação de película entre

3 a 4 horas de secagem. Vale ressaltar que todos os testes foram realizados primeiramente sem extrato e em posterior momento incorporou-se o extrato hidroalcoólico filtrado.

O verniz H foi descartado devido à impossibilidade de filtrar maiores quantidades de sedimentos insolúveis. Os vernizes A, D e E apresentaram maior sedimentação depois de agitado. Seguiram-se os testes de caracterização de secagem, pH e condutividade elétrica para o melhor verniz que teve menor deposição de sedimentos no fundo do pote após a agitação por 24 horas e que demonstrou ter maior estabilidade. A melhor resposta de verniz base de quitosana para os testes foi a formulação G resultando no produto de figura 5 e representada com seu estudo crítico farmacotécnico no quadro 1.

Figura 5. Verniz a base de quitosana G.



Fonte: Autor (2019).

Quadro 1. Componentes da formulação G de verniz de quitosana.

| COMPONENTES | ESTUDO CRÍTICO |
|--|--------------------------|
| Extrato seco de <i>Cymbopogon citratus</i> | Ativo vegetal |
| Quitosana (QTS) | Geleificante |
| Álcool P.A. | Solvente volátil |
| Glicerina | Modulador de viscosidade |
| Ácido acético | Polimerizador químico |
| Água destilada q.s.p | Veículo |

Fonte: Ferreira (2009); De Luca (2011); Autor (2019)

Desta forma, com os resultados obtidos, pode-se inferir que a solubilidade da quitosana depende do nível de acetilação da quitina e de seu peso molecular, aumentando de acordo com sua

densidade. Segundo Abreu (2013), a solubilidade da quitosana foi estimada de 0,5g polímero em solução 2% de ácido acético, podendo ajustar as concentrações para melhores resultados. Portanto, o valor da concentração da quitosana enquadrou-se em relação aos níveis de solubilidade e adequado de acordo com as necessidades de acréscimo na formulação, no caso de 1% a 10 % no verniz.

A quitosana é um material ideal para a liberação prolongada de fármacos por ser biocompatível e biodegradável, além de ser um polímero de carga positiva que se combina à parede celular das bactérias, conferindo ação bactericida e bacteriostática a esse material (UYSAL et al., 2011). A capacidade de formar uma película e de ser mucoaderente, aliadas às propriedades citadas, torna a quitosana a base ideal para liberação de fármacos e extratos vegetais de forma lenta, no caso deste trabalho, o extrato de *Cymbopogon citratus* pois o polímero liga-se às mucosas devido à interação eletrostática entre as cargas positivas e as cargas negativas das superfícies da película adquirida (NETO, 2014).

5.3 Avaliação de atividade antimicrobiana in vitro de extrato e verniz

Primeiramente obtiveram-se resultados para a atividade antimicrobiana do extrato hidroalcoólico de *C. citratus* e posteriormente resultados da atividade antimicrobiana do verniz dental com o extrato de *C. citratus* já incorporado. As diluições do extrato hidroalcoólico de *Cymbopogon citratus* tiveram suas diferenças de concentração subtraída de acordo com a CBM de cada microorganismo para as diluições do álcool 70%. Apenas *Candida albicans* ATCC 14053, *Enterococcus faecalis* ATCC 29212 e *Staphylococcus aureus* IC tiveram CBM igual a base do extrato na concentração de 25 mg/mL. A CBM para *Streptococcus mutans* é a mesma para a concentração inibitória mínima, pois as semeaduras em placas de ágar-sangue após 24 horas indicaram crescimento negativo para colônias nos títulos 1: 16 ou 0,625% do extrato hidroalcoólico. O extrato hidroalcoólico foi testado em cada microorganismo obtendo-se os seguintes resultados na tabela 2:

Tabela 2. Atividade antimicrobiana de extratos hidroalcoólicos de *C. citratus* na concentração inicial antes do primeiro poço de 50 mg/mL.

| Microrganismo | CIM | CBM/CFM |
|---|-------------|------------|
| <i>Streptococcus mutans</i> ATCC 700610 | 3,125 mg/mL | 3,125mg/mL |

Continua

| | | Conclusão |
|---|-------------|------------|
| <i>Candida albicans</i> ATCC 14053 | 6, 25 mg/mL | 25 mg/mL |
| <i>Candida Albicans</i> IC | 3,125 mg/mL | 6,25 mg/mL |
| <i>Enterococcus faecalis</i> ATCC 29212 | 3,125 mg/mL | 25 mg/mL |
| <i>Enterococcus</i> IC 15087185 | 3,125 mg/mL | Ausente |
| <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923 | 6,25 mg/mL | Ausente |
| <i>Staphylococcus aureus</i> IC | 3,125 mg/mL | 25 mg/mL |

Fonte: Autor (2019)

Legenda: CIM – Concentração inibitória mínima; CBM – Concentração bactericida mínima; CFM – Concentração fungicida mínima; ATCC – American Type Culture Collection; IC – Isolado clínico;

Após descobrir os valores da CIM e CBM para os extratos realizou-se a microdiluição para a atividade antimicrobiana do verniz incorporados com extrato. Os valores da Concentração Inibitória Mínima (CIM) do produto testados sobre as cepas estão representados na tabela 3.

Tabela 3. Atividade antimicrobiana de verniz incorporado com extrato de *C. citratus* com concentração antes do primeiro poço de 100mg/mL.

| Microrganismo | CIM | CBM/CFM |
|---|-------------|------------|
| <i>Streptococcus mutans</i> ATCC 700610 | 3,125 mg/mL | 3,125mg/mL |
| <i>Candida albicans</i> ATCC 14053 | 3,125 mg/mL | 6,25 mg/mL |
| <i>Candida Albicans</i> IC | 6,25 mg/mL | 12,5 mg/mL |
| <i>Enterococcus faecalis</i> ATCC 29212 | 6,25 mg/mL | 12,5 mg/mL |
| <i>Enterococcus</i> IC 15087185 | 6,25 mg/mL | 12,5 mg/mL |
| <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923 | 6,25 mg/mL | 25mg/mL |
| <i>Staphylococcus aureus</i> IC | 6,25 mg/mL | 25mg/mL |

Fonte: Autor (2019)

Legenda: CIM – Concentração inibitória mínima; CBM – Concentração bactericida mínima; CFM – Concentração fungicida mínima; ATCC – American Type Culture Collection; IC – Isolado clínico;

A CBM para *Streptococcus mutans* é a mesma para a concentração inibitória mínima, pois as semeaduras em placas de ágar-sangue após 24 horas indicaram crescimento negativo para colônias nos títulos 1: 32 ou 0,3125 % do extrato no produto.

Os resultados para as diluições do extrato hidroalcoólico e do verniz com o extrato demonstraram que tem maior eficácia sobre *Streptococcus mutans* em relação aos outros

microrganismos testados, já *Candida albicans* e *Enterococcus faecalis* mostraram-se ter atividades semelhantes em relação a menor concentração inibitória mínima. Em relação ao extrato hidroalcoólico apenas *Staphylococcus aureus* mostrou-se menos efetiva devido maior concentração da CIM.

Com os valores obtidos pela microdiluição, infere-se que é variada a quantidade de propriedades terapêuticas, entre elas a atividade antimicrobiana, pois o impacto de produtos naturais sobre doenças infecciosas humanas tem merecido muito interesse nas últimas décadas (LEITÃO et al., 2004; TAKARADA et al., 2004). Produtos naturais de algumas plantas, fungos, bactérias e outros organismos continuam a ser usados em preparações farmacêuticas, e em composto puro ou extratos (ARAÚJO & LEON, 2001). Portanto, há uma necessidade de avaliar se há alguma atividade antimicrobiana relacionada aos microrganismos encontrados na cavidade bucal capazes de serem inibidos pelo extrato de capim-limão e que possam impedir o comensalismo relacionado aos microrganismos oportunistas em associação com *S. mutans* (MURDOCH, et al., 2004; SMITH, et. al, 2003.; SIQUEIRA, 2004).

Em relação a necessidade de estudar a atividade antimicrobiana do extrato para *C. albicans* está no fato da presença do microrganismo ter a capacidade de potencializar a formação da cárie, pois o crescimento e adesão da levedura podem ser aumentados pela alta concentração de glicose na saliva e pode servir como nutrientes para os organismos da *Candida spp.* (ARSLAN et al., 2016). Segundo Anibal (2007), os extratos de plantas mostram-se promissores com as espécies de *Candida sp.* testadas, pois os dados indicam a necessidade da ampliação do conhecimento sobre as espécies de plantas com potencial antimicrobiano, além de se testar extratos mais purificados e com propriedades farmacológicas ativas contra organismos microbianos.

Ainda há poucas evidências comprovadas de que o óleo essencial de *Cymbopogon citratus* sozinho possa combater ou reduzir o biofilme cariogênico, pois Almeida et al. (2013) destacam que na contagem de unidades formadoras de colônias de *S. mutans*, quando organizados em biofilme misturado com *S. aureus* e *C. albicans*, não houve diferença estatística entre o grupo tratado com óleo de *C. citratus* e grupos controle. Sendo assim, é importante estudar outras formas de apresentação do *C. citratus*, tais como o extrato hidroalcoólico, pois o efeito microbicida de um antibiótico no biofilme ocorre apenas nos microrganismos posicionados na camada mais externa do biofilme, deixando os saudáveis que estão presentes na camada interna. Esses dados sugerem que a formação de um biofilme composto por *S. mutans*, *S. aureus* e *C. albicans*, o microrganismo

S. mutans pode ocupar a posição do biofilme mais interno e assim tornar-se mais resistente ao óleo essencial de *C. citratus* (DUNNE, 2003).

O verniz de quitosana sem extrato incorporado, utilizado com controle negativo, não resultou em atividade antimicrobiana em nenhuma das diluições contra os microrganismos testados neste trabalho o que corrobora com resultados já existentes para verniz de quitosana elaborado por De Luca (2011). Porém contraria resultados promissores da atividade antimicrobiana, em que a maioria dos trabalhos *in vitro* pesquisados na literatura, afirmam que a quitosana e seus derivados apresentam ação antimicrobiana sobre estreptococos orais (IKINCI et al., 2002; DECKER et al., 2005).

5.4 Controle de qualidade físico-químico e microbiológico

5.4.1 Tempo de secagem

Os vernizes A, D e E apresentaram maior quantidade de sedimentação nas placas de petri e foram descartados para testes de caracterização. Os vernizes B e C não apresentaram sedimentos, porém não teve tempo de secagem satisfatória mesmo em estufa de circulação de ar ou temperatura ambiente, tornando-se liquefeitos, instáveis e com mais higroscópico, roavelmente em decorrência de plastificante na fórmula. A formulação G (Figura 6) sem incorporação do extrato leva até 30 minutos para secar em temperatura ambiente e 15 minutos em estufa a 37° C. Após a incorporação do extrato o tempo reduziu consideravelmente entre 10 a 15 min tanto em temperatura ambiente com na estufa.

Figura 6. Verniz G base e incorporado com extrato seco de *Cymbopogon citratus*.



Fonte: Autor (2019)

Em ordem crescente de utilização de quantidade de polímero natural e do verniz incorporado com extrato (Quadro 2), observou-se que o tempo de secagem é favorecido pelas características próprias do extrato, assim como as reduzidas concentrações de glicerina ou reduzidas quantidades de água. As características sensoriais como cor e odor se assemelharam ao extrato vegetal.

Quadro 2. Relação de concentração de quitosana e tempo de secagem de verniz de incorporado com extrato vegetal.

| | Verniz (base) A | Verniz (base) B | Verniz (base) C | Verniz (base) D | Verniz (base) E | Verniz (base) F | Verniz G |
|----------------------|---------------------------|---------------------------|------------------------------------|------------------------------------|-------------------------------------|---------------------------------------|---------------------------------------|
| Concentração de QTS* | 1% | 2% | 2% | 2% | 2,5% | 2% | 5% |
| Tempo de secagem | 24h em estufa | 24h em estufa | 2-3h em estufa de circulação de ar | 2-3h em estufa de circulação de ar | 2-3h em circulação de estufa com ar | 30 min em ambiente e 10 min em estufa | 10 min em ambiente e 10 min em estufa |
| Metodologia | Adaptação Ferreira (2009) | Adaptação Ferreira (2009) | Adaptação Ferreira (2009) | Adaptação Ferreira (2009) | Adaptação Ferreira (2009) | Adaptação de DeLucca (2011) | Adaptação de DeLucca (2011) |

Fonte: Autor (2019)

Diversas amostras de vernizes testadas não tiveram estabilidade suficiente para prosseguir com os testes, pois em um medicamento, significa a capacidade de manter as propriedades físicas, químicas, terapêuticas e microbiológicas originais durante o tempo de estocagem e uso pelo paciente. Este tempo, no qual se assegura sua integridade, representa o período de validade (PRISTA, 2008). A intenção é que o tempo de aplicação seja entre um a quatro minutos, dependendo do número de dentes (CARVALHO, et al. 2010). Adequou-se o produto até atingir estabilidade suficiente para formar película em tempo hábil. Entre elas a melhor fórmula encontrou-se com o verniz G.

Todas as fórmulas testadas tiveram entre seus componentes a glicerina como modulador de viscosidade, porém o tempo de secagem foi prejudicado pela grande quantidade nas primeiras formulações, pois a mesma pode ter função farmacotécnica de umectante retendo mais moléculas de água para a formulação (MILAN, 2007).

5.4.2 Resultados para qualidade físico-química do verniz

Por meio de medidor de pH (pHmetro), picnômetro e viscosímetro e visualizaencontrou-se os seguintes valores tabelados:

Tabela 4. Características físico-químicas de verniz na ausência e na presença do extrato.

| | VERNIZ BASE | VERNIZ INCORPORADO |
|----------------------|--------------------|---------------------------|
| PH | 5,2 ± 0,5 | 5,18 ± 0,5 |
| CONDUTIVIDADE | 122 mV | 123 mV |
| DENSIDADE | 1,026 mg/mL | 0,902 mg/mL |
| VISCOSIDADE | 250,8 mPa/s | 255,3 mPa/s |

Legenda: mV – milivolts; mg – miligrama; nL – mililitros; mPa/s – milipascal por segundo.

Fonte: Autor (2019)

A relação da presença de um umectante com o tempo de secagem podem estar envolvidas, mesmo que intuitivamente, pois ainda não se dispõe de estudos evidentes que atestem a relação deste constituinte com a estabilidade de parâmetros reológicos, tal como da viscosidade aparente, que permite a propriedade de espalhamento sobre as superfícies (SILVA et al. 2013).

Os testes de secagem, pH, condutividade elétrica e densidade garantem diminuir os fatores intrínsecos relacionados ao processo de manipulação do medicamento, tais como procedimentos, métodos, técnicas, equipamentos, princípios ativos e inativos (excipiente, conservantes, corantes e aromatizantes), tamanho das partículas, alteração nos aspectos físicos (precipitação, presença de gases, uniformidade da dose, recipientes e grau de impurezas), incompatibilidades, entre outros (ANVISA, 2010).

5.4.3 Resultados para controle de qualidade microbiológico

Para este tipo de teste foi utilizado a formulação com maior viabilidade de secagem e incorporação do extrato como o a formulação G. Não foi observada a presença de coliformes totais em todas as amostras, e a partir deste resultado não foi observado a presença de coliformes termotolerantes que poderiam ser inoculados no caldo EC. Das amostras analisadas não foram encontrados contaminação microbiana, sendo que na técnica de tubos múltiplos não foi encontrada a presença de coliformes e não se encontrou coliformes termotolerantes.

Pela técnica de semeadimento em profundidade (Pour Plate) utilizando PCA e de superfície (Spread Plate) utilizando o meio Sabouraud-dextrose não houve crescimento de nenhum microrganismo (Quadro 3). A técnica geral de indicação de microrganismos pode ser utilizada tanto para bactérias heterotróficas como para a contagem de outros grupos, gêneros ou espécies de microrganismos. Essa versatilidade é decorrente do método de que cada célula microbiana presente em uma amostra, quando fixada em um meio de cultura sólido adequado, irá formar uma colônia visível e isolada (CETESB, 1998).

Quadro 3. Avaliação da qualidade microbiológica de formulação para verniz G.

| ALÍQUOTA | COLIFORMES TERMOTOLERANTES | COLIFORMES TOTAIS | POUR PLATE | SPREAD PLATE |
|-------------------|---------------------------------------|------------------------------|-----------------------|---------------------|
| ALÍQUOTA 1 | Ausente | Ausente | Ausente | Ausente |
| ALÍQUOTA 2 | Ausente | Ausente | Ausente | Ausente |
| ALÍQUOTA 3 | Ausente | Ausente | Ausente | Ausente |

Fonte: Autor (2019)

Desta forma, o controle de qualidade microbiológica garante tanto a esterilidade para o teste de sensibilidade antimicrobiana quanto à resistência ao crescimento de microrganismos se manterem dentro dos limites especificados, pois a contaminação microbiana pode levar ao comprometimento do desempenho do produto devido à quebra da estabilidade da formulação, alteração das características físicas e aparência e levar a inativação dos princípios ativos e excipientes da formulação (YAMAMOTO, 2000). Os padrões de qualidade microbiológicos são estabelecidos em legislações da ANVISA, onde estão descritos os limites máximos permitidos e quais os microrganismos patogênicos que não podem estar presentes (BRASIL, 2014). A ausência de ausência de coliformes, termotolerantes, *Lactobacillus spp.* fermentadores e colônias de fungos garantem a qualidade do produto finalizado.

5.5 Teste de bloqueio de adesão bacteriana em discos de hidroxiapatita

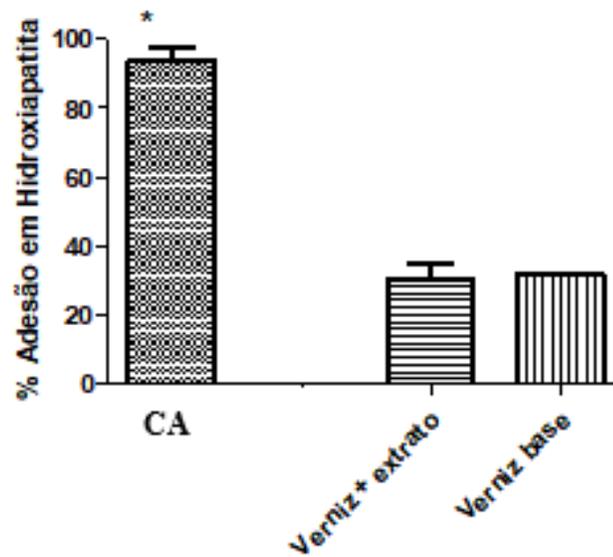
A elaboração do produto é necessária para impedir a capacidade de formação do biofilme, e conseqüentemente, relacionadas pelos seus fatores de virulência, dentre eles, a tolerância ao meio ácido favorecida pela atividade de deslocamento de prótons pela ATPase (QUIVEY et al., 2000) e

os mecanismos de adesão da bactéria à superfície dental. Um importante fator de adesão deste microrganismo é a síntese de glucanos solúveis e insolúveis, por meio das enzimas glucosiltransferases - GTFs (MARSH, 2005).

Os glucanos, principalmente os insolúveis em água, têm sido considerados os principais fatores de aderência e acúmulo de estreptococos cariogênicos sobre a superfície dental (SCHILLING, 1992). Com isso, tem sido demonstrado que estes glucanos aumentam a porosidade (BOWEN, 2002) bem como causam mudanças na composição inorgânica da matriz da placa (CURY et al., 2000), tornando-a ainda mais cariogênica. Além dos mecanismos supracitados, há outros mecanismos que merecem uma investigação científica mais aprofundada, pois também podem promover a colonização destes microrganismos por meio da formação de sítios de ligação para a bactéria, pela síntese de proteínas relacionadas à adesão (SHEMESH et al., 2007).

Para verificar se a efetividade do verniz experimental ocorre na fase de aderência do microrganismo realizou-se os testes de adesão bacteriana. Os dados estão expressos em média \pm desvio padrão do percentual de adesão em quatro indivíduos de discos de hidroxiapatita em triplicata representados pela figura 7.

. **Figura 7.** Bloqueio de adesão bacteriana de *S. mutans* UA 159700610 em corpos de prova de hidroxiapatita na presença do verniz incorporado com extrato e do verniz base.



Fonte: Autor (2019)

Legenda: CA (Controle de adesão): Suspensão de microrganismo com bhi + discos de hidroxiapatita; *

Nível de confiança estatístico p – valor < 0,05.

Há um nível de confiança estatístico de 95%, rejeitando-se a hipótese nula dos microrganismos não terem aderido ao disco de hidroxiapatita. Diante desses resultados, infere-se que o verniz-base e o verniz incorporado com o extrato têm capacidades semelhantes de impedir a adesão da bactéria à superfície do esmalte dentário, pois estatisticamente, as porcentagens de adesão encontraram-se em valores aproximados de 40% em relação ao controle de adesão. Desta forma, há chances de tanto o extrato quanto o produto, sem efeito adicional, interferirem na adesão do microrganismo a superfície do esmalte dentário o que corrobora com os resultados para imersão em óleo essencial presentes no estudo de Rêgo et al. (2016).

6. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os resultados demonstram que foi possível elaborar o verniz dental de quitosana com tempo de secagem variando entre 10 a 20 minutos e incorporar com extrato seco de capim-limão com concentração de 100 mg/mL, porém o tempo de secagem ainda não chegou ao tempo esperado de quatro minutos.

Durante o desenvolvimento do verniz odontológico notou-se que a incorporação dos extratos influencia na formação da película sobre a lâmina de vidro, uma vez que o mesmo adquiriu as características do extrato em relação à cor e odor.

O teste de adesão deve ser feito para outros tipos de microrganismos comensais que junto com *Streptococcus mutans* formam o biofilme dental e possa impedir a formação do mesmo.

As formulações foram elaboradas para suprirem as necessidades de produtos baratos e alternativos que podem substituir os já existentes no mercado, assim como contribuir para o desenvolvimento tecnológico nacional e internacional.

Estes incorporados com os extratos presentes na flora brasileira, no caso o capim-limão, apresentaram atividade antimicrobiana satisfatória, pois encontrou-se títulos de concentrações apresentando atividades consideráveis contra *Streptococcus mutans*, *Candida albicans*, *Enterococcus faecalis*, e *Staphylococcus aureus* se revelando um veículo aplicável. Em contrapartida, a sua utilização depende da adequação da produção com estudos da estabilidade ao armazenamento da formulação, testes de liberação controlada do extrato, e efeito farmacológico. Fazendo-se necessário a continuidade da pesquisa, pois são necessárias reparações no aspecto comercial do produto, tais como, cor e sabor, futuros aspectos negativos recorrentes.

A formulação G é o verniz que apresentou melhores características de incorporação do extrato e destina-se a ter um produto estável que possa ser lançado no mercado e tenha depósito de patente de modelo de utilidade, ou seja, um aperfeiçoamento industrial “novo”, pois já existe modelo semelhante descrito na literatura (INPI, 2013).

REFERÊNCIAS

ABREU, F. O. M. S., CAVALCANTE, L. G., DOUDEMONT, P. V., CASTRO, A. M., NASCIMENTO A. P. Propriedades e características da quitosana obtida a partir do exoesqueleto de caranguejo-uçá utilizando radiação de microondas. **Polímeros**, São Carlos, v. 23, n.5, p.630-635, 2013.

ADDY, M., SLAYNE M. A., WADE W. G. 1992. The formation and control of dental plaque - an overview. **J Appl Bacteriol** 73: 269-278.

ALMEIDA, M. A. O., BOTURA, M. B., SANTOS, M. M., ALMEIDA, G. N., DOMINGUES, L. F., COSTA, S. L., BATATINHA MJM. Efeitos dos extratos aquosos de folhas de *Cymbopogon citratus* (DC) Stapf (Capim Santo) e *Digitaria insularis* (L) Fedde (Capim-Açu) sobre cultivo de larvas de nematóides gastrintestinais de caprinos. **Rev Bras Parasitol.**, 12(3):125-129, 2003.

ALMEIDA, R. B. A.; CARRETO, C. F. P; SANTANA, R. S.; FURLAN, M. R.; JUNQUEIRA, J. C.; JORGE, A. O. C. Antimicrobial activity of *Cymbopogon citratus* (DC.) stapf against *Candida* spp. **Rev Odontol UNESP**. 2008; 37(2): 147-153.

ALMEIDA, R. B. A.; AKISUE, G.; CARDOSO, L. M. L.; JUNQUEIRA, J. C.; JORGE, A. O. Antimicrobial activity of the essential oil of *Cymbopogon citratus* (DC) Stapf. on *Staphylococcus* spp., *Streptococcus mutans* and *Candida* spp. **Rev. Bras. Pl. Med.**, Campinas, v.15, n.4, p.474-482, 2013.

ALVARENGA AL, SCHWAN RF, DIAS DR, SCHWANESTRADA KRF, BRAVO-MARTINS CEC. Atividade antimicrobiana de extratos vegetais sobre bactérias patogênicas humanas. **Rev Bras Pl Med**, 9(4):86-91, 2007.

ANVISA. AGENCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. Resolução da diretoria colegiada- RDC n° 67, de 08 de Outubro de 2007. Disponível em:< www.anvisa.gov.br/legis> Acessado em: 08 mai. 2019c.

APHA; AWWA; WEF. Multiple tube fermentation technique for members of the coliform group. In: **Standard Methods for the Examination of Water and wastewater**. 21st ed. Washington DC: APHA, 2005. Section 9221.

ARAÚJO, C. A. C. & LEON L. L. Biological activities of *Curcuma longa* L. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**. Vol. 96, p.723-728. 2001.

ARSLAN, S., KOÇ, A. N., ŞEKERCI, A. E., TANRIVERDI, F., SAV, H., AYDEMIR, G., DIRI H: Genotypes and virulence factors of *Candida* species isolated from oral cavities of patients with type 2 diabetes mellitus. **Turk J Med Sci** 2016;46:18-27.

ALVES, T.M.S., SILVA, C.A., SILVA, N.B., MEDEIROS, E.B. and VALENÇA, A.M.G., 2010. Atividade antimicrobiana de produtos fluoretados sobre bactérias formadoras do

biofilme dentário: estudo in vitro. **Pesquisa Brasileira em Odontopediatria e Clínica Integrada**, vol. 10, no. 2, pp. 209-216. <http://dx.doi.org/10.4034/1519.0501.2010.0102.0013>.

ANVISA. AGENCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. **Resolução da diretoria colegiada- RDC nº 17**, de 16 de abril de 2010. Disponível em: <www.anvisa.gov.br/legis> Acessado em: 07 ago. 2018.

ANIBAL, P. C.. Potencial de ação antimicrobiana in vitro de extratos de plantas na inibição de *Candida* spp, *Streptococcus mutans* e *Staphylococcus aureus*. **Dissertação de mestrado** - Paula Cristina Anibal. -- Piracicaba, SP : [s.n.], 2007.

AZEVEDO, V. V. C. et al. **Revista Eletrônica de Materiais e Processos**. ISSN 1809-8797. v.2.3 pag. 27-34, 2007.

AZEVEDO, C. L.; MARQUES, M. M.; BOMBANA, A. C. Cytotoxic effects of cyanoacrylates used as retrograde filling materials: an in vitro analysis. **Pesqui Odontol Bras**. 2003; 17 (2):113-8.

BACHIEGA, T. F., SFORCIN, J. M. Lemongrass and citral effect on cytokines production by murine macrophages. **Journal of Ethnopharmacology** 137 (2011) 909–913, 2011.

BOCHRA K. A., TAREK, Z. A., HAJER H. B., AMINA B. Cell surface hydrophobicity, biofilm formation, adhesives properties and molecular detection of adhesins genes in *Staphylococcus aureus* associated to dental caries. **Microbial Pathogenesis** 49 (2010) 14-22.

BOWEN, W. H. Wither or whither caries research? **Caries Res**. 1999;33(1):1-3.

BOWEN, W. H. Do we need to be concerned about dental caries in the coming millennium? **Crit Rev Oral Biol Med**. 2002; 13(2): 126-31.

BRASIL, Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Resolução RDC nº 26**, de 13 de maio de 2014. Dispõe sobre o registro de medicamentos fitoterápicos e o registro e a notificação de produtos tradicionais fitoterápicos. Brasília: Diário Oficial da União, 2016.

BRIGHENTI, F. L., MEDEIROS, A. C., MATOS, B. M., RIBEIRO, Z. E. A., KOGAITO, C. Y.: Evaluation of caries-associated virulence of *Candida albicans* isolated from saliva of pediatric patients with sickle-cell anemia. **J Appl Oral Sci** 2014; 22 (6): 484-9.

BRITO, A. M. G. *Atividade do óleo essencial de Cymbopogon citratus (DC.) Stapf e Citral contra leishmaniose visceral*. 2013. Aracaju. 88 p. **Tese (Doutorado em Biotecnologia), Rede Nordeste de Biotecnologia – RENORBIO**, Universidade Federal de Sergipe. Aracaju, SE.

BRUM, R. B. C. S. *Efeito de óleos essenciais no controle de fungos fitopatogênicos*. 2012. Gurupi. 135p. **Tese (Mestrado em Produção Vegetal)**, Universidade Federal do Tocantins. Gurupi, TO.

CARVALHO, D.M. et al. O uso de vernizes fluoretados e a redução da incidência de cárie dentária em pré-escolares. **Rev Bras Epidemiol** 2010; 13(1): 139-49.

CARVALHO, T. P.; MASKE, T. T.; SIGNORI, C.; BRAUNER, K. V.; OLIVEIRA, E. F. Desenvolvimento de lesões de cárie em dentina em um modelo de biofilme simplificado *in vitro*: um estudo piloto. **Rev. odontol. UNESP** vol.47 no.1 Araraquara Jan./Feb. 2018 Epub Feb 22, 2018.

CASTRO M. L., CURY J. A., ROSALEN P. L., ALENCAR S. M., IKEGAKI M., DUARTE S. & KOO H. Própolis do sudeste e nordeste do Brasil: influência da sazonalidade na atividade antibacteriana e composição fenólica. **Quím. Nov.** 30(7):1512-1516, 2007.

CETESB. **Norma técnica L5.202**: Coliformes totais e fecais – Determinação do número mais provável pela técnica de tubos múltiplos. São Paulo: 1998. p. 39.

CHANDRA J, MUKHERJEE PK, LEIDICH SD, FADDOUL FF, HOYER LL, DOUGLAS LJ, et al. Antifungal resistance of candidal biofilms formed on denture acrylic in vitro. **J Dent Res.** 2001; 80(3): 903-8.

CLINICAL LABORATORY STANDARDS INSTITUTE (CLSI). **Methods for dilution antimicrobial susceptibility test for bacteria that grow aerobically, seventh edition.** Approved standard M7-A8. CLSI, Wayne, PA, 2009.

CURY, J. A., REBELO, M. A., DEL BEL CURY, A. A., DERBYSHIRE, M. T., TABCHOURY, C. P. Biochemical composition and cariogenicity of dental plaque formed in the presence of sucrose or glucose and fructose. **Caries Res.** 2000; 34(6): 491-497.

DE LUCA, M. P. Verniz à base de quitosana contendo própolis verde brasileira: avaliação da atividade antimicrobiana, citotoxicidade e perfil de liberação. **Disseratação (Mestrado em Odontologia)** – Faculdade de Odontologia da Universidade Federal de Minas Gerais. Belo Horizonte, p.15-23, 2011.

DECKER, E. M.; VON OHLE, C.; WEIGER, R.; WIECH, I.; BRECX, M. A synergistic chlorhexidine/chitosan combination for improved antiplaque strategies. **J Periodont Res;** 40: 373–377, 2005.

DIDILESCU AC, SKAUG N, MARICA C, DIDILESCU C. Respiratory pathogens in dental plaque of hospitalized patients with chronic lung diseases. **Clin Oral Investig** 2005;9:141-147.

FEJERSKOV, O.; KIDD, E. **Cárie dentária: a doença e seu tratamento clínico.** Ed. Santos, São Paulo, 352 p., 2005.

FERREIRA, A. O. **Guia Prático de Farmácia Magistral.** 3.ed., São Paulo: Pharmabooks, 2009.

FERRO, D. **“Fitoterapia – conceitos clínicos”** (livro com cd-rom). Editora Atheneu, São Paulo, 2008.

FERRO, V. O.; OLIVEIRA, I.; JORGE, L. J. F. Diagnose comparativa de três espécies vegetais comercializadas como “ervas cidreiras” *Lippia alba* (MILL) N.E.Br ex Britt & Wilson.

Cymbopogon citratus (D.C.) Stapf e *Melissa officinalis* L. **Lecta**, Bragança Paulista. v. 14, n. 2, p. 53-63. 1996.

FREIMOSER, F. M.; JAKOB, C. A.; AEBI, M.; TUOR, U. The MTT [3-(4,5-Dimethylthiazol2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide] assay is a fast and reliable method for colorimetric determination of fungal cell densities. **Applied and environmental Microbiology** 65(8):3727- 3729. 1999.

FREITAS, A. L. D.; KAPLUM, V.; PEREIRA, D. C. R.; SILVA, L. B. R.; MELHEM, M. S. C.; TABORDA, C. P.; MELLO, J. C. P.; NAKAMURA, CV & Ishida, K. **Proanthocyanidin polymeric tannins from *Stryphnodendron adstringens* are effective against *Candida spp.* isolates and for vaginal candidiasis treatment.** *J Ethnopharmacol.* 216: 184-190, 2018.

FARIA, R. L. L.; VILA, T. V. M.; DE MELLO, J. C. P.; NAKAMURA, C. V.; ROZENTAL, S & ISHIDA, K. **Proanthocyanidins polymeric tannin from *Stryphnodendron adstringens* are active against *Candida albicans* biofilms.** *BMC Complement. Altern. Med.* 15(1), 2015.

GÁLVEZ JLH, TORRES IP, AGUILAR OEA, LARA ML. Estudio del efecto diurético de la hoja de *Cymbopogon citratus* en modelo de ratas. **Rev Cubana Plantas Medicinales**, 3(2):79-82, 1998.

GOMES, E. C.; NEGRELLE, R. R. B. ***Cymbopogon citratus* (D.C.) Stapf: aspectos botânicos e ecológicos.** *Visão Acadêmica*, Curitiba, v. 4, n. 2, p. 137-144, 2003.

GOMES, E. C.; NEGRELLE, R. R. B. Análise da cadeia produtiva do capim limão: estudo de caso. **Rev. Bras. Pl. Med.**, Campinas, v.17, n.2, p.201-209, 2015.

HEYDER CDT, SILVA DAK. Avaliação da atividade antifúngica do óleo volátil de *Cymbopogon citratus* sobre *Candida krusei* e *Candida parapsilosis*. **Rev Saúde e Ambiente**, 5(2):7-12, 2004.

IKINCI G., SENEL S., AKINCIBAY H., KAS S., ERCIS S., WILSON CG et al. Effect of chitosan on a periodontal pathogen *Porphyromonas gingivalis*. **Int J Pharm** 2002; 235: 121-27.

INPI – Instituto Nacional de Propriedade Intelectual. **Resolução PR nº 85 de 11/04/2013** - Instituir a Diretriz de Exame de patente de Modelo de Utilidade. Ministério do Desenvolvimento, Indústria e Comércio Exterior, 2013.

ILLUM, L. Chitosan and its use as a pharmaceutical excipient. **Pharm Res**; 15:1326-1331, 1998.

LEITÃO, D. P. S.; SILVA FILHO, A. A.; POLIZELLO, A. C. M.; BASTOS, J. K.; SPADARO, A. C. C. Comparative evaluation of in-vitro effects of brazilian green propolis and *Baccharis dracunculifolia* extracts on cariogenic factors of *Streptococcus mutans*. **Biol Pharm Bull.** 2004;27:1834-39.

LOU, Z; CHEN, J; YU, F; WANG, H; KOU, X; MA, C & ZHU, S. The antioxidant, antibacterial, antibiofilm activity of essential oil from *Citrus medica* L. var. *sarcodactylis* and its nanoemulsion. **LWT-Food. Sci. Technol.** 80: 371-377, 2017.

LUCENA, B. F. F; TINTINO, S. R.; FIGUEREDO, F. G.; OLIVEIRA, C. D. M.; AGUIAR, J. J. S.; CARDOSO, E. N.; AQUINO, P. E. A.; ANDRADE JC.; COUTINHO, H. D. M.; MATIAS, E. F. F. Avaliação da atividade antibacteriana e moduladora de aminoglicosídeos do óleo essencial de *Cymbopogon citratus* (DC.) Stapf. **Acta biol. Colomb.**, 2015;20(1):39-45.

MALTZ M, CARVALHO J. **Diagnóstico da doença cárie.** In: ABOPREV: Promoção de saúde bucal. São Paulo: Artes Médicas, 1997. p.69-91.

MARINHO, V. C. C.; WORTHINGTON, H. V.; WALSH, T.; CLARKSON, J. E. Fluoride varnishes for preventing dental caries in children and adolescents. **Cochrane Database of Systematic Reviews**, 2013, Issue 7. Art. No.: CD002279.

MARSH, P. D. Antimicrobial strategies in the prevention of dental caries. **Caries Res** 1993;27(1): 72-76.

MARSH, P. D. Dental plaque: biological significance of a biofilm and community lifestyle. **Clin Periodontol.** 2005; 32(Suppl 6): 7-15.

MASKE, T. T., VAN DE SANDE, F. H., ARTHUR, R. A., HUYSMANS, M. C. D. N. J. M., CENCI, M. S. *In vitro* biofilm models to study dental caries: a systematic review. **Biofouling.** 2017 Sep;33(8):661-75. PMID:28792234.

MATOS, F. J. A., **Introdução à fitoquímica experimental.** Edições. Fortaleza, UFC, 141 p. 1997.

MATOS, F. J. A. **Introdução a fitoquímica experimental.** 3. ed. Fortaleza: UFC, 2009. 150 p.

MENEZES, T.O.A.; ALVES A.C.B.A.; VIEIRA, J.M.S.; MENEZES, S.A.E.; ALVES, B.P.; MENDONÇA,L.C.V. Avaliação in vitro da atividade antifúngica de óleos essenciais e extratos de plantas da região amazônica sobre cepa de *Candida albicans*. **Ver Odontol UNESP**, v.38, p.184-191, 2009.

METZGER, Z. Macrophages in periapical lesions. **Endod Dent Traumatol.** 2000; 16:1-8.

MILAN, A. L. K et. al. Estudo da hidratação da pele por emulsões cosméticas para xerose e sua estabilidade por reologia. **RBC.** São Paulo – SP, Brasil, 43(4), p.650, 2007.

MOSMANN T.; Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. **J Immunol Methods.** 1983 Dec 16;65(1-2):55-63.

MOYNIHAN P. Sugars and dental caries: evidence for setting a recommended threshold for intake. **Adv Nutr.** 2016 Jan;7(1):149-56. PMID:26773022.

MURDOCH FE, SAMMONS RL, CHAPPLE IL. Isolation and characterization of subgingival staphylococci from periodontitis patients and controls. **Oral Dis** 2004;10:155-62.

NETO, B. P. C. Micropartículas de quitosana estruturadas com aerosil®: estabilidade, adsorção, encapsulação e liberação de substâncias ativas. **Tese (Doutorado)** - Universidade Federal do Rio Grande do Norte. Centro de Tecnologia. Departamento de Engenharia Química. Programa de Pós-graduação em Engenharia Química. Natal, p. 14, 2014.

OGAARD B, SEPPA L, ROLLA G. Professional topical fluoride applications-clinical efficacy and mechanism of action. **Advances in Dental Research**. 1994;8:190–201.

OLIVEIRA, R. A. Avaliação antimicrobiana *in vitro* de quitosana e da associação quitosana/clorexidina sobre saliva e *Streptococcus mutans*. **Dissertação de Mestrado apresentado ao programa interunidades em Bioengenharia** – escola de engenharia de São Carlos, Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Instituto de Química de São Carlos, 2004.

PECIULIENE, V. et al. Isolation of *Enterococcus faecalis* in previously root-filled canals in a Lithuanian population. **J Endodon**, v. 26, n. 10, p. 593-595, 2000. 7.

PELAH, D.; The use of commercial saponin from *Quillaja saponaria* bark as a natural larvicidal agent against *Aedes aegypti* and *Culex pipiens*. **J. Ethnopharmacol.**, v.81, p. 407-409, 2002.

PESSAN, J.P; AL-IBRAHIM, N.S; BUZALAF, M.A.R; TOUMBA, K.J. Slow-release fluoride devices: a literature review. **J Appl Oral Sci**;16(4):238-44, 2008.

PETERSSON LG, TWETMAN S, DAHLGREN H, NORLUND A, HOLMAK, NORDENRAM G, et al. Professional fluoride varnish treatment for caries control: a systematic review of clinical trials. **Acta Odontologica Scandinavica**, 2004;62(3):170–6.

PLANTS data base. *Cymbopogon citratus*. Disponível em: . Acesso em: 23 fev. 2019.

PRINS, C.L. et al. Efeitos de confinamento do sistema radicular sobre capim-limão (*Cymbopogon citratus*). **Revista Ciencia Agronomica**, v.39, n.3, p.416-421, 2008.

PRISTA, N.L.; ALVES, C.A.; MORGADO, R. **Tecnologia Farmacêutica; estabilidade dos medicamentos**. Lisboa: Fundação Calouste Gulbenkian: 2008.

QUIVEY, R. G. Jr, KUHNERT, W. L., HAHN, K. Adaptation of oral streptococci to low pH. **Adv Microb Physiol**. 2000; 42: 239-274.

RÊGO, C. B., SILVA, A. M., GONÇALVES, L. M.; PASCHOAL, M. A. B., In vitro antimicrobial activity of essential oil of *Cymbopogon citratus* (lemon grass) on *Streptococcus mutans* biofilm. **Afr. J. Microbiol. Res.** Vol. 10(31), pp. 1224-1228, 21 August, 2016.

RIBEIRO, L. G. M. Efeito de diferentes posologias do verniz de clorexidina a 1% nos níveis de estreptococos do grupo *mutans* na saliva e no biofilme dental. **Dissertação (Mestrado)**

em Clínica odontológica) – Faculdade de Odontologia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Porto Alegre, p. 30, 2005.

ROSA, O. P. S., ROCHA, R. S. S. Clorexidina e cárie dentária. **CECADE News**. 1993 jan-ago;1(1/2):1-24.

SCHILLING, K. M., BOWEN, W. H., 1992. Glucans synthesized in situ in experimental salivary pellicle function as specific binding sites for *Streptococcus mutans*. **Infection and Immunity**. 60, 284–295.

SCHOLZ, Caroline et al. Efeito anticárie do flúor associado ao trimetafosfato de sódio. **Rev. Assoc. Paul. Cir. Dent.** 2016, vol.70, n.2, pp. 147-150.

SILVA et al. Análise da influência do agente umectante na estabilidade reológica e avaliação de cristais líquidos em formulações cosméticas. **Rev. Bras. Farm.** 94 (3): 199–210, 2013.

SINHA, V. R.; SINGLA, A. K.; WADHAWAN,.; KAUSHIK, S. R.; KUMRIA, R. K.; BANSAL; DHAWAN, R. Chitosan microspheres as a potential carrier for drugs. **International Journal of Pharmaceutics**. Volume 274, Issues 1–2, 2004, Pages 1-33, ISSN 0378-5173, <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2003.12.026>.

SHEIHAM A, JAMES WP. Diet and dental caries: the pivotal role of free sugars reemphasized. **J Dent Res**. 2015 Oct;94(10):1341-7. PMID:26261186.

SHEMESH, M., TAM, A., STEINBERG, D. Expression of biofilm-associated genes of *Streptococcus mutans* in response to glucose and sucrose. **J Med Microbiol**. 2007; 56(Pt 11): 1528-1535.

SHIBASAKI, K.; MATSUKUBO, T; TAKAESU, Y. Cariostatic effect of low molecular weight chitosan in rats. **Shikwa Gakuho**; 95, 1-17, 1995.

SCHUCK VEJA, FRATINI M, RAUBER CS, HENRIQUES A, SCHAPOVAL EES. Avaliação da atividade antimicrobiana de *Cymbopogon citratus*. **Braz J Pharm Sci**. 2001;37(1):45-9.

SIQUEIRA JUNIOR, J. F.; SEN, B. H. Fungi in endodontic infections. **Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology and Endodontics**. v. 97, n. 5, p. 632-641, 2004.

SMITH, A. J.; ROBERTSON, D.; TANG, M. K.; JACKSON, M. S.; MACKENZIE, D.; BAGG J. *Staphylococcus aureus* in the oral cavity: a three-year retrospective analysis of clinical laboratory data. **Br Dent J** 2003;195:701-703.

SOARES, S. P.; VINHOLISA, A. H. C.; CASEMIRO, L. A.; SILVA, M. L. A.; CUNHA, W. R.; MARTINS, C. H. G. Atividade antibacteriana do extrato hidroalcoólico bruto de *Stryphnodendron adstringens*. **Rev. odonto ciênc**. 2008;23(2):141-144.

SOUSA, C. M. M. et al. Fenóis totais e atividade antioxidante de cinco plantas medicinais. **Química Nova**, v. 30, n. 2, p. 351- 355, 2007.

STROHMENGER L, BRAMBILLA E. The use of fluoride varnishes in the prevention of dental caries: a short review, **Oral Diseases**. n. 7. p. 71-80, 2001.

TAKARADA, K.; KIMIZUKA, R.; TAKAHASHI, N.; HOMMA, K.; OKUDA, K.; KATO, T. A comparison of the antibacterial efficacies of essential oils against oral pathogens. **Oral Microbiol Immunol**. 2004;19(1):61-4.

TANIKAWA, K. L.;SANTOS, E.M., GUEDES, C.C., MOTTA, L. J.; Sandra Avaliação *In vitro* do potencial antimicrobiano de cinco tipos diferentes de flúor e clorexidina. Red de **Revistas Científicas de América Latina y el Caribe, España y Portugal**, São Paulo, SP, 2007.

THANOU, M.; VERHOEF, J.C.; JUNGINGER, H.E. Oral drug absorption enhancement by chitosan and its derivates. **Adv Drug Deliv Rev**; 52: 117-126, 2001.

UYSAL, T.; AKKURTB, M.D.; AMASYALIC, M.; OZCAND, S.; YAGCIE, A.; BASAKF, F.; SAGDICG, D. Does a chitosancontaining dentifrice prevent demineralization around orthodontic brackets? **Ang Orthod**; 81(2), 319-325, 2011.

VAN DER MEI, H.C.; ENGELS, E.; DE VRIES, J.; DIJKSTRA, R.J.B.; BUSSCHER, H.J. Chitosan adsorption to salivary pellicles. **Eur J Oral Sci**; 115: 303–307, 2007.

VAN RIJKOM, H. M.; TRUIN, G. J., VAN 'T HOF, M. A. A meta-analysis of clinical studies on the caries-inhibiting effect of chlorhexidine treatment. **J Dent Res**. 1996 Feb;75(2):790-5.

VILLAVICENCIO, Judy et al . Effects of a food enriched with probiotics on *Streptococcus mutans* and *Lactobacillus* spp. salivary counts in preschool children: a cluster randomized trial. **J. Appl. Oral Sci.**, Bauru , v. 26, e20170318, 2018.

YAMAMOTO, C.H. et al. Contaminação microbiana em matérias-primas de origem natural empregadas em farmácia de manipulação. **Farmácia e Química**, São Paulo, v. 33, n. 1, p. 42- 47, 2000.

ZANATTA FD, RÖSING CKC. Clorexidina: mecanismos de ação e evidências atuais de sua eficácia do contexto do biofilme supragengival. **Scientific-A**. 2007;1(2):35-43.

ZAREMBA ML, STOKOWSKA W, KLIMIUK A, DANILUK T, ROZKIEWICZ D, CYLWIKROKICKA D, et al. Microorganisms in root carious lesions in adults. **Adv Med Sci** 2006;51(Suppl. 1):237e40.