



**UNIVERSIDADE ESTADUAL DA PARAÍBA**  
**CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ODONTOLOGIA**

**EMMANUEL ALBUQUERQUE DE SOUZA**

**Avaliação das potencialidades farmacológicas em Periodontia  
de extratos e óleos essenciais de *Croton blanchetianus* Baill.**

**CAMPINA GRANDE – PB**

**JULHO/2014**

**EMMANUEL ALBUQUERQUE DE SOUZA**

**Avaliação das potencialidades farmacológicas em Periodontia  
de extratos e óleos essenciais de *Croton blanchetianus* Baill.**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Odontologia da Universidade Estadual da Paraíba em cumprimento às exigências para obtenção do título de Mestre em Clínica Odontológica.

Orientadora: Prof<sup>ª</sup> Dr<sup>ª</sup> Ana Cláudia Dantas de Medeiros

**CAMPINA GRANDE – PB**

**JULHO/2014**

É expressamente proibida a comercialização deste documento, tanto na forma impressa como eletrônica. Sua reprodução total ou parcial é permitida exclusivamente para fins acadêmicos e científicos, desde que na reprodução figure a identificação do autor, título, instituição e ano da dissertação.

S729a Souza, Emmanuel Albuquerque de.  
Avaliação das potencialidades farmacológicas em periodontia de extratos e óleos essenciais de *Croton blanchetianus* Bail. [manuscrito] / Emmanuel Albuquerque de Souza. - 2014. 160 p. : il. color.

Digitado.  
Dissertação (Mestrado em Odontologia) - Universidade Estadual da Paraíba, Centro de Ciências Biológicas e da Saúde, 2014.

"Orientação: Profa. Dra. Ana Cláudia Dantas de Medeiros, Departamento de Odontologia".

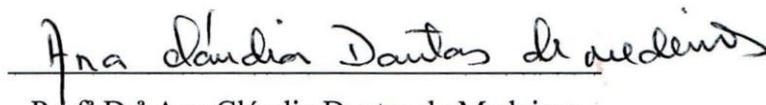
1. Fitoterapia. 2. Periodontia. 3. Microbiologia bucal. I. Título.

21. ed. CDD 615.321

Avaliação das potencialidades farmacológicas em Periodontia  
de extratos e óleos essenciais de *Croton blanchetianus* Baill

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Odontologia da Universidade Estadual da Paraíba como parte dos requisitos para obtenção do grau de mestre em Odontologia, área de Clínica Odontológica.

**BANCA EXAMINADORA**



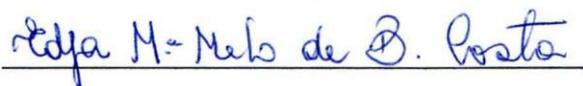
Profª Drª Ana Cláudia Dantas de Medeiros

**Orientadora (CCBS/UEPB)**

---

Profª Drª Mary Ann Foglio

**Examinadora Externa (CPQBA/UNICAMP)**



Profª Drª Edja Maria de Melo Costa

**Examinadora Interna (CCBS/UEPB)**

## **DEDICATÓRIA**

Esta dissertação é dedicada àqueles cuja sapiência imemorial soergueu aos átrios da maestria um a-lumno, em sua casta efeméride.

Sou-lhes grato, doutos mortais, pelas máximas de tino e erudição, doadas a este mero aprendiz em termos de irrestrita paixão.

E tenho dito.

**“Palavra puxa palavra, uma ideia traz outra, e assim se faz um livro, um governo, ou uma revolução, alguns dizem que assim é que a natureza compôs as suas espécies.”**

**“Eu gosto de catar o mínimo e o escondido. Onde ninguém mete o nariz, aí entra o meu, com a curiosidade estreita e aguda que descobre o encoberto.”**

**“Prefiro cair do céu a cair de um prédio de dois andares.”**

**(Machado de Assis)**

# AGRADECIMENTOS

---

Aos meus pais, pelo esforço sobrehumano para me oferecerem uma educação digna e por serem exemplos de integridade, honestidade, respeito, humanidade e persistência.

À minha orientadora Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Ana Cláudia, primeiramente, por aceitar ser minha orientadora, por todo tempo destinado a mim, pela liberdade que me deu na realização desta pesquisa, por ser um exemplo de pesquisadora, orientadora, mãe e amiga.

À minha turma de mestrado 2012.2, companheiros de estudos, histórias, conversas, risadas, viagens, enfim, vocês estarão pra sempre guardados em meu coração.

A Karla Monik, por, literalmente, pegar na minha mão pra me ensinar a pipetar, por me mostrar a diferença entre uma pipeta e uma proveta, por acreditar em mim quando muitos duvidavam do meu trabalho.

A todos os alunos do Laboratório de Desenvolvimento e Ensaio de Medicamentos (LABDEM), Fernanda, Rennè, Aline, Ana Michele, Jéssica, Davi, Ayrla, Jocimar, Laianne, Deise, Tiago e Cleildo por me auxiliarem em muitas análises, pelo aprendizado, pela paciência e pelo companheirismo.

Ao Prof. Dr. Carlos Sarmiento pelos ensinamentos em Periodontia, pelo exemplo de profissional e pelas longas conversas na Clínica Integrada.

À Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Wanda e seu orientando Maciel pela orientação durante as análises toxicológicas.

A Danilo por me receber como um grande amigo, durante minhas análises e atividades afins na Universidade Federal de Alagoas.

Aos professores Cassiano, Gustavo e Polliana e aos técnicos de Laboratório de Patologia Bucal da UEPB, Denise e Ana Luzia Denise, por abrirem às portas do laboratório de Patologia Bucal.

Ao Prof. Dr. Pedro Rosalén, por me acolher tão bem em Piracicaba, por ser um grande exemplo de orientador e de dedicação ao desenvolvimento da pesquisa.

Ao Prof. Dr. Severino Alencar e a Adna que me auxiliaram durante as análises na Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz (ESALQ-USP).

A Profª Drª Mary Ann, seus orientandos e técnicos do Laboratório de Química, do Centro Pluridisciplinar de Pesquisas Químicas, Biológicas e Agrícolas da Universidade Estadual de Campinas (CPQBA-UNICAMP).

A Bruno Vilela, por me recepcionar em seu apartamento e por viver grandes histórias comigo em Piracicaba.

À Karina, Lívia, Bruna, Carol e a todos os alunos, funcionários e técnicos do Laboratório de Farmacologia, Anestesiologia e Terapêutica da Faculdade de Odontologia da Universidade Estadual de Campinas (FOP-UNICAMP).

A todos os professores que participam do Programa de Pós-Graduação em Odontologia da Universidade Estadual da Paraíba, que doam tempo, conhecimento e dedicação na construção de um programa consistente, duradouro e de referência em pesquisa na área odontológica.

Às agências de fomento à pesquisa representadas pela Coodenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) e pelo Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq).

# LISTA DE FIGURAS

---

## REVISÃO DA LITERATURA

Figura 1: Representação da associação entre as bactérias da placa subgengival, a superfície dental e os tecidos periodontais.

Figura 2: Representação diagramática da formação da placa dental através de mecanismos de coagregação.

Figura 3: Fórmula estrutural do gluconato de clorexidina.

Figura 4: *Croton blanchetianus* Baill.

Figura 5: Esquema de um cromatógrafo à gás acoplado a um espectrômetro de massas. (Fonte: Chiaradia et al., 2008).

## CAPÍTULO I

Figura 1: Gráfico dos valores observados (eixo horizontal) x valores preditos (eixo vertical).

Figura 2: Superfície de resposta da CIM para *S. mutans* em função das proporções álcool:água (A:A) e vegetal:solvente (V/S).

Figura 3: Superfície de resposta da CIM para *S. oralis* em função das proporções álcool:água(A:A) e vegetal:solvente (V/S).

Figura 4: Superfície de resposta da CIM para *S. salivarius* em função das proporções álcool:água(A:A) e vegetal:solvente (V/S).

Figura 5: Superfície de resposta da CIM para *S. parasanguinis* em função das proporções álcool: água(A:A) e vegetal:solvente (V/S).

## CAPÍTULO II

Figura 1: Cromatogramas obtidos a partir de CG-EM das amostras de ENM. Eixo horizontal: Tempo de retenção( $T_R$ ) (em minutos); Eixo vertical: Abundância relativa dos constituintes na amostra.

Figura 2: Curvas TG e DSC do extrato nebulizado de *C. blanchetianus* Baill (ENM).

Figura 3: Percentual de *F. nucleatum*, aderidos após 24 horas de tratamento, com diversas concentrações (em  $\mu\text{g.ml}^{-1}$ ) do ENM.

Figura 4: Diagrama apresentando a percentagem e desvio-padrão de macrófagos RAW 264.7 viáveis após 48 horas de tratamento, com diferentes concentrações de ENM.

Figura 5: Fotomicrografias das culturas de macrófagos RAW 269.7, após 48 horas de tratamento, com diferentes concentrações do ENM com resolução de 100x.

Figura 6: Fotomicrografias de cortes transversais do tecido esplênico de fêmeas de ratos Wistar (Grupo-Controle) coradas em hematoxilina-eosina (HE).

Figura 7: Fotomicrografias do tecido esplênico de fêmeas de ratos Wistar (Grupo-Teste) submetidas ao teste de toxicidade aguda. Cortes transversais corados em hematoxilina-eosina (HE).

## CAPÍTULO III

Figura 1: Cromatogramas obtidos a partir de CG-EM das amostras de ELU (vermelho), ELT (azul) e ELM (preto).

Figura 2: Curvas TG e DSC dos extratos ELU, ELM e ELT obtidos por diferentes métodos de extração.

Figura 3: Curvas TG e DSC dos extratos liofilizados de *C. blanchetianus* Baill. obtidos por diferentes métodos de extração.

Figura 4: Percentagem de *F. nucleatum*, aderidos após 24 h de tratamento com diversas concentrações (em  $\mu\text{g.mL}^{-1}$ ) de ELM, ELU e ELT.

Figura 5: *Box-plot* apresentando a citotoxicidade *in vitro*, relacionando as porcentagens de macrófagos RAW 264.7 viáveis, após 48 h de tratamento com diferentes concentrações de ELM, ELT e ELU.

Figura 6: Fotomicrografias das culturas de macrófagos RAW 269.7, após 48 h de tratamento com diferentes concentrações do ELU de *C. blanchetianus* Baill, feitas em microscópio invertido de fase (Nikon Eclipse TS 100), 100x;

#### CAPÍTULO IV

Figura 1: Cromatogramas obtidos a partir de CG-EM das amostras de OEC (preto) e OEF (vermelho). Eixo horizontal: Tempo de retenção ( $T_R$ ) (em minutos); Eixo vertical: Abundância relativa dos constituintes na amostra.

Figura 2: Curvas TG e DSC dos óleos essenciais da casca (OEC) e da folha (OEF) de *C. blanchetianus* Baill.

Figura 3: Percentual de *F. nucleatum*, aderidos após 24 horas de tratamento, com diversas concentrações (em  $\mu\text{g/ml}$ ) de OEC e OEF.

Figura 4: Porcentagem de macrófagos RAW 269.7 viáveis após 48h de tratamento com diversas concentrações (em  $\mu\text{g/ml}$ ) das amostras de OEF (A) e OEC (B).

Figura 5: Fotomicrografias das culturas de macrófagos RAW 269.7, após 48 horas de tratamento com diferentes concentrações do OEC de *C. blanchetianus* Baill, feitas em microscópio invertido de fase (Nikon Eclipse TS 100), 100x.

Figura 6: Fotomicrografias das culturas de macrófagos RAW 269.7, após 48 horas de tratamento com diferentes concentrações do OEF de *C. blanchetianus* Baill, feitas em microscópio invertido de fase (Nikon Eclipse TS 100), 100x.

# LISTA DE QUADROS E TABELAS

---

## REVISÃO DA LITERATURA

Quadro 1: Classificação filogenética dos periodontopatógenos que foram avaliados nesta pesquisa.

## CAPÍTULO I

Tabela 1. Níveis das variáveis utilizadas no planejamento ( $2^2$ ).

Tabela 2: Cepas bacterianas utilizadas na triagem microbiológica.

Tabela 3: Análise estatística relacionando as concentrações inibitórias mínimas (CIM) das bactérias testadas aos métodos de obtenção de extratos hidroalcoólicos de *C. blanchetianus* Baill (casca).

Tabela 4: Relação dos experimentos e das respostas das variáveis dependentes às condições das variáveis independentes.

Tabela 5: Análise estatística e efeito estimado das variáveis independentes sobre as respostas (CIMs das bactérias testadas).

Tabela 6: Análise de variância (ANOVA) para as respostas, obtida a partir da otimização das proporções de vegetal (V) e hidroalcoólica (P) (valores de  $p$ ).

Tabela 7: Coeficientes de regressão para os valores das respostas no modelo experimental.

## CAPÍTULO II

Tabela 1: Constituintes do ENM, identificados por CG-EM.

Tabela 2: Dados de Termogravimetria (TG) referentes às etapas de decomposição do ENM.

Tabela 3: Dados DSC referentes aos processos de transições endotérmicos e exotérmicos, observados do ENM.

Tabela 4: Concentrações inibitórias mínimas (CIMs), em ( $\mu\text{g.mL}^{-1}$ ), do ENM frente a periodontopatógenos.

Tabela 5: Estatística descritiva da distribuição dos percentuais de *F. nucleatum* aderidas após tratamento, com as diversas concentrações testadas da amostra do ENM.

Tabela 6: Estatística descritiva da distribuição dos percentuais de macrófagos viáveis, após teste de citotoxicidade com diversas concentrações testadas de ENM.

Tabela 7: Efeito da administração via oral do extrato de ENM na evolução ponderal, peso dos órgãos, consumo de ração e água em ratos Wistar albinos adultos durante 14 dias.

Tabela 8: Efeito da administração via oral do ENM, nos parâmetros bioquímicos em ratos Wistar, durante 14 dias.

Tabela 9: Efeito da administração via oral do extrato de ENM, nos parâmetros hematológicos em ratos Wistar, durante 14 dias.

### CAPÍTULO III

Tabela 1: Constituintes dos extratos liofilizados de *C. blanchetianus* Baill obtidos por maceração (M), ultrassom (U) e turbólise (T) identificados por CG-MS.

Tabela 2: Dados de calorimetria diferencial exploratória (DSC) referentes aos processos de transições endotérmicos e exotérmicos, observados nas amostras de ELU, ELM e ELT.

Tabela 3: Dados de Termogravimetria (TG) referentes às etapas de decomposição nas amostras ELM, ELU e ELT. .

Tabela 4: Concentrações inibitórias mínimas (CIMs), em ( $\mu\text{g.mL}^{-1}$ ), dos extratos liofilizados da casca de *C. blanchetianus*, obtidos por diferentes métodos extrativos, na triagem sobre *Streptococcus* sp e frente à periodontopatógenos.

Tabela 5: Relação das médias das porcentagens de *F. nucleatum* aderidas, entre as diversas concentrações (em  $\mu\text{g/ml}$ ) testadas das amostras de ELU, ELM e ELT.

## CAPÍTULO IV

Tabela 1: Constituintes dos óleos essenciais da casca (OEC) e da folha (OEF) de *C. blanchetianus* Baill identificados por CG-EM.

Tabela 2: Dados de Termogravimetria (TG) referentes às etapas de decomposição nas amostras de OEC e OEF.

Tabela 3: Dados de calorimetria diferencial exploratória (DSC) referentes aos processos de transições endotérmicos e exotérmicos, observados nas amostras de OEC e OEF.

Tabela 4: Concentrações inibitórias mínimas (CIMs) de OEC e OEF frente a periodontopatógenos e *Streptococcus* sp.

Tabela 5: Relação das médias dos percentuais de *F. nucleatum* aderidas, entre as diversas concentrações testadas das amostras de OEC e OEF.

Tabela 6: Relação das médias da viabilidade celular para macrófagos RAW 264.7 entre as diversas concentrações testadas das amostras de OEC e OEF.

# LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

---

ANVISA: Agência Nacional de Vigilância Sanitária;

*ATCC: American Type Culture Collection;*

A/A: Proporção álcool/água;

*BHI: Brain Heart Infusion;*

°C: Graus Celsius;

CCTR: Centro de Ciências Tecnológicas e Rurais;

CG-EM: Cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas; CIM: Concentração Inibitória Mínima;

*CLSI: Clinical Laboratory Standards Institute;*

DSC: Calorimetria Diferencial Exploratória;

DMEM: Dulbecco's Modified Eagle's Medium

ELM: Extrato liofilizado obtido por maceração;

ELU: Extrato liofilizado obtido por ultrassom;

ELT: Extrato liofilizado obtido por turbólise;

ENM: Extrato nebulizado obtido por turbólise;

h: horas

mg: miligramas;

min: minutos;

mL: mililitros;

MTT: 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium;

PF: Ponto de Fusão;

PE: Ponto de Ebulição;

PMSF: Phenyl-methyl-sulfanyl;

S.m: *Streptococcus mutans*;

S.o: *Streptococcus oralis*;

S.p: *Streptococcus parasanguinis*;

S.s: *Streptococcus salivarius*;

RAW: Macrófagos;

rpm: rotações por minutos;

TG: Termogravimetria;

TSB: *Trypticase Soy Broth*;

UFC: Unidades Formadoras de Colônias;

UFCG: Universidade Federal de Campina Grande;

V/S: Proporção Vegetal/Solvente;

%: Porcentagem;

µg: microgramas

µL: microlitros;

## RESUMO

---

Os produtos de origem natural, obtidos de plantas utilizadas na medicina tradicional são considerados uma boa alternativa ao tratamento das doenças periodontais. Esse trabalho avaliou os aspectos químicos, biológicos e toxicológicos de extratos e óleos essenciais de *Croton blanchetianus* Baill. Extratos hidroalcoólicos foram avaliados por técnicas de planejamento fatorial; e extratos nebulizado, liofilizados e óleos essenciais foram obtidos por diferentes técnicas e caracterizados através de Cromatografia Gasosa acoplada a Espectrometria de Massas (CG-EM) e técnicas Termoanalíticas. *Streptococcus mutans*, *S. oralis*, *S. salivarius*, *S. parasanguinis*, *Porphyromonas gingivalis*, *Prevotella intermedia*, *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* e *Fusobacterium nucleatum* foram avaliados por microdiluição, sendo determinadas suas Concentrações Inibitórias Mínimas (CIMs); para esta última bactéria também foi avaliada a atividade antibiofilme. Na citotoxicidade *in vitro*, foram realizados ensaios de viabilidade celular com macrófagos RAW 269.7; e no ensaio de toxicidade aguda em ratos Wistar, com o extrato menos tóxico foram avaliados parâmetros hematológicos, bioquímicos e ponderais. O extrato hidroalcoólico com maior efetividade antibacteriana frente a *Streptococcus* sp, foi obtido por turbólise, na concentração vegetal de  $0,14 \text{ mg.ml}^{-1}$  e na proporção álcool:água de 70%; Através de CG-EM, identificou-se que os extratos liofilizados por maceração (ELM), ultrassom (ELU) e turbólise (ELT) possuem os mesmos fitoconstituintes, com grande quantidade de monossacarídeos, mas no ELT a proporção de todos os compostos é menor. Os principais compostos identificados nos óleos essenciais foram:

$\alpha$ -pineno,  $\gamma$ -Cadineno,  $\beta$ -pineno e D-limoneno. O extrato nebulizado (ENM) foi o que apresentou maior efetividade antibacteriana sobre periodontopatógenos, dentre todas as amostras avaliadas neste estudo, apresentando CIM de  $15,6 \text{ }\mu\text{g.ml}^{-1}$  sobre todas as bactérias avaliadas, e quando utilizado na concentração de  $31,2 \text{ }\mu\text{g.ml}^{-1}$  apenas 4,1% das cepas de *F. nucleatum* permaneceram aderidas às placas de poliestireno. O ENM foi a amostra menos citotóxica, apresentando a concentração de  $100 \text{ }\mu\text{g.ml}^{-1}$  como a maior dose não tóxica às culturas de macrófagos e na análise toxicológica em modelos animais, não induziu nenhum animal à morte, nem provocou alterações dos parâmetros hematológicos e bioquímicos, podendo ser considerado um fitoterápico seguro. Portanto, o *C. blanchetianus* Baill tem ampla aplicabilidade biológica e os ensaios realizados *in vitro* apontam que extratos liofilizados, nebulizado e óleos essenciais têm grandes perspectivas no tratamento das doenças periodontais.

# Sumário

---

INTRODUÇÃO.....	20
Objetivos.....	23
1. Objetivo geral.....	23
2. Objetivos específicos.....	23
Revisão da Literatura.....	25
1. Perspectivas microbiológicas na formação do biofilme dental.....	25
2. Expressão de fatores de virulência.....	27
2.1 <i>Streptococcus</i> sp. ....	28
2.2 Periodontopatógenos.....	31
3. Respostas inflamatória e imunológica na doença periodontal.....	35
4. Controle químico do biofilme dental.....	38
5. Aplicações terapêuticas da fitoterapia na periodontia.....	40
5.1. <i>Croton blanchetianus</i> Baill.....	42
6. Caracterização química de fitoterápicos através de métodos cromatográficos. ....	45
6.1. Cromatografia Gasosa.....	45
7. Caracterização termoanalítica.....	48
REFERÊNCIAS.....	50
CAPÍTULO I.....	62
RESUMO.....	62
1. INTRODUÇÃO.....	63
2. MATERIAIS E MÉTODOS.....	64
2.1. Coleta e identificação do material vegetal.....	64
2.2. Obtenção dos extratos hidroalcoólicos.....	65
2.3. Desenho do estudo.....	65
2.4. Triagem antibacteriana sobre <i>Streptococcus</i> sp. ....	66
2.5. Análise estatística.....	67
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	68
4. CONCLUSÕES.....	77
REFERÊNCIAS.....	78
CAPÍTULO II.....	80
RESUMO.....	80
1. INTRODUÇÃO.....	81
2. MATERIAIS E MÉTODOS.....	82
2.1. Coleta e identificação do material vegetal.....	82

2.2.	Obtenção do extrato vegetal .....	83
2.3.	Cromatografia Gasosa acoplada a Espectrômetro de Massas (CG-EM) .....	83
2.4.	Análise Térmica .....	84
2.5.	Atividade antimicrobiana sobre periodontopatógenos .....	84
2.6.	Atividade antibiofilme sobre <i>Fusobacterium nucleatum</i> .....	85
2.7.	Teste de citotoxicidade em macrófagos .....	86
2.8.	Ensaio de toxicidade aguda .....	86
2.9.	Análise Estatística .....	87
3.	RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	88
4.	CONCLUSÕES .....	103
	REFERÊNCIAS .....	103
	CAPÍTULO III .....	108
	RESUMO .....	108
1.	INTRODUÇÃO .....	109
2.	MATERIAIS E MÉTODOS .....	110
2.1.	Coleta e identificação do material vegetal .....	110
2.2.	Obtenção dos extratos vegetais .....	111
2.3.	Cromatografia Gasosa acoplada a Espectrômetro de Massas (CG-EM) .....	111
2.4.	Análise Térmica .....	112
2.5.	Avaliação da atividade antimicrobiana sobre patógenos orais .....	112
2.6.	Atividade antibiofilme sobre <i>Fusobacterium nucleatum</i> .....	113
2.7.	Teste de citotoxicidade em macrófagos .....	114
2.8.	Análise Estatística .....	115
3.	RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	115
4.	CONCLUSÕES .....	128
	REFERÊNCIAS .....	129
	CAPÍTULO IV .....	132
	RESUMO .....	132
1.	INTRODUÇÃO .....	133
2.	MATERIAIS E MÉTODOS .....	134
2.1.	Coleta e identificação do material vegetal .....	134
2.2.	Obtenção dos óleos essenciais .....	134
2.3.	Cromatografia Gasosa acoplada a Espectrômetro de Massas (CG-EM) .....	135
2.4.	Análise Térmica .....	136
2.5.	Avaliação da atividade antimicrobiana sobre patógenos orais .....	136

2.6.	Atividade antibiofilme sobre <i>Fusobacterium nucleatum</i> .....	137
2.7.	Teste de citotoxicidade em macrófagos.....	138
2.8.	Análise Estatística.....	138
3.	RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	139
4.	CONCLUSÕES .....	152
	REFERÊNCIAS.....	153
	CONCLUSÕES .....	157
	PROPOSTAS E PERSPECTIVAS .....	160

A decorative graphic featuring a stylized leaf on the left, with a thick black line and a thinner wavy line extending horizontally across the page. The word "INTRODUÇÃO" is centered over the thick line.

# INTRODUÇÃO

# INTRODUÇÃO

---

As principais doenças periodontais correspondem à gengivite, patologia que acomete os tecidos periodontais de proteção – gengiva inserida e livre – e periodontite, na qual os danos biológicos acometem, também, tecidos de sustentação – osso alveolar, cemento e ligamentos periodontais. Como resultado, na periodontite ocorre rompimento do ligamento do tecido conectivo à superfície da raiz e migração apical do epitélio juncional, resultando na formação de bolsa periodontal, a qual reflete perda de osso alveolar e aumento da mobilidade dentária (DAVIS et al., 2013).

Na avaliação da patogênese das doenças periodontais destaca-se a participação de vários fatores que podem influenciar o início e a progressão da doença, as características clínicas e a resposta ao tratamento instituído. Estes fatores estão relacionados, principalmente, com a especificidade e patogenicidade da microbiota componente do biofilme dental e com a resposta imunológica e inflamatória do hospedeiro (HAROKOPAKIS et al., 2006; JUIZ et al., 2010).

O biofilme dental pode ser definido como uma comunidade microbiana séssil, aderida à superfície dental e extremamente organizada. Conforme o biofilme vai se formando, diversas mudanças locais ocorrem, pois com o aumento da quantidade de matriz extracelular, as camadas mais internas passam a apresentar menor disponibilidade de alguns nutrientes e de oxigênio (DARVEAUE et al., 1997; BEDRAN et al., 2010).

A utilização de agentes químicos no controle do biofilme dental tem sido avaliada na periodontia há décadas e podem romper as estruturas intermicrobianas, desorganizando-as. Dessa forma, é importante que esses agentes possam agir sobre as diferentes etapas de formação do biofilme, desde sua constituição supragengival e aerófila, até sua extensão subgengival e anaeróbia (HOLT, EBERSOLE, 2005; BYRNE et al., 2009).

Apesar de vários agentes estarem comercialmente disponíveis, esses produtos químicos podem alterar a microbiota oral e o uso prolongado desses antibacterianos sintéticos pode induzir as manifestações secundárias, como infecções fúngicas, além de ocasionarem, em alguns casos, comprometimento estético, com manchas nos dentes, e disfunções gustativas. Assim, a procura por produtos alternativos é imprescindível, e os produtos de origem natural, obtidos de plantas utilizadas na medicina tradicional são considerados uma boa alternativa aos

produtos sintéticos (NEUMEGEN, FERNADEZ-ALBA, CHISTI, 2005; BIDAUT, CHANDAD, GRENIER, 2007;).

Os produtos naturais são fontes abundantes de compostos biologicamente ativos, e estes têm sido historicamente utilizados para o desenvolvimento de novos compostos para a indústria farmacêutica. Flavonoides e outros polifenóis, terpenos, alcaloides e óleos essenciais são exemplos de compostos determinados através de estudos fitoquímicos em plantas da flora brasileira, com excelente atividade biológica em diversas patologias (POLOMBO, 2011).

Diversas famílias de plantas medicinais presentes no nordeste brasileiro têm sido estudadas com resultados promissores, os quais podem ser vistos como perspectiva para sua utilização em âmbito odontológico. Vegetais pertencentes à família Euphorbiaceae, a exemplo do *Croton* sp. têm sido avaliados pelo seu potencial fitoterápico em estudos etnobotânicos e em análises laboratoriais que apontam um grande potencial antibacteriano sobre microrganismos da cavidade oral (McCHESNEY, CLARK, SILVEIRA, 1991; ALBUQUERQUE et al., 2007; CARTAXO et al., 2010).

Dessa forma, esta pesquisa objetivou avaliar o potencial fitoterápico de extratos e óleos essenciais de *Croton blanchetianus* Baill na periodontia. Para isso, avaliamos sua ação sobre células responsáveis pela resposta inflamatória e sobre bactérias envolvidas na patogênese das doenças periodontais, estudou-se os aspectos toxicológicos inerentes ao vegetal e realizaram-se estudos de caracterização química e térmica das amostras.



# Objetivos

---

## 1. Objetivo geral

Avaliar o potencial farmacológico de extratos e óleos essenciais de *Croton blanchetianus* Baill na periodontia.

## 2. Objetivos específicos

- Identificar, a partir de um planejamento experimental, qual método extrativo propicia maior atividade antibacteriana entre diversas proporções de extratos hidroalcoólicos de *C. blanchetianus* Baill;
- Avaliar a atividade antibacteriana do extrato nebulizado, o que desempenhar melhor atividade antibacteriana nesse planejamento experimental;
- Avaliar a atividade antibacteriana do extrato nebulizado, dos extratos liofilizados e dos óleos essenciais sobre bactérias periodontopatogênicas planctônicas e em biofilme de *F. nucleatum*, desenvolvido *in vitro*;
- Avaliar a citotoxicidade do extrato nebulizado, dos extratos liofilizados e óleos essenciais em linhagens de células macrófagos RAW 269.7;
- Realizar testes de toxicidade aguda em ratos com o extrato que apresentar menor toxicidade no teste de viabilidade celular;
- Caracterizar através de Cromatografia gasosa acoplada à Espectrometria de Massas (CG-EM) o extrato nebulizado, os extratos liofilizados e óleos essenciais;
- Caracterizar através de métodos termoanalíticos (DSC e TG/DTG) o extrato nebulizado, os extratos liofilizados e óleos essenciais;



# REVISÃO DA LITERATURA

# Revisão da Literatura

## 1. Perspectivas microbiológicas na formação do biofilme dental

---

Estima-se que mais de 500 espécies de bactérias podem colonizar a cavidade oral de um adulto; normalmente um indivíduo abriga 150 ou mais microrganismos diferentes. Essa microbiota vive de forma comensal, mas sob condições específicas, aumento de massa e/ou patogenicidade e/ou redução da resposta do hospedeiro, a doença pode ser desencadeada. A microbiota periodontal é extremamente complexa, afetando o hospedeiro, o ambiente oral e o tratamento periodontal. A habilidade de adesão das bactérias é fundamental para o desenvolvimento de doenças infecciosas, como a gengivite e periodontite (MOORE et al., 1994; STINGU et al., 2008; DAVIS et al., 2013).

A adesão bacteriana pode ocorrer em tecidos moles, como mucosa, e tecidos duros, como dentes. Entretanto, as superfícies dentais são peculiares pois apresentam uma superfície não-descamativa dura, que permite o desenvolvimento de depósitos bacterianos estruturados, além de formarem uma interrupção ectodérmica única. O acúmulo e o metabolismo de patógenos nesses tecidos duros são considerados como causas primárias de cárie dentária e doenças periodontais. O crescimento bacteriano em superfícies, denominado de biofilme, pode ser definido como uma comunidade bacteriana complexa, numa matriz de substâncias poliméricas extracelulares como polissacarídeos, proteínas e ácidos nucléicos, interligada por canais que removem produtos residuais e levam nutrientes para as camadas mais profundas. (WOOD et al, 2000; NEWMAN et al., 2011)

A importância do biofilme para as doenças orais, como a cárie e a periodontite, juntos com a facilidade com a qual a superfície dental pode ser acessada, tornou a placa dental um dos sistemas de biofilme mais estudados. Espera-se que havendo o entendimento dos mecanismos que envolvem o acúmulo da placa dental seja possível melhorar o controle sobre esses processos e restringir as doenças orais associadas a essa estrutura (HE, XI, 2009; PASICH et al., 2013).

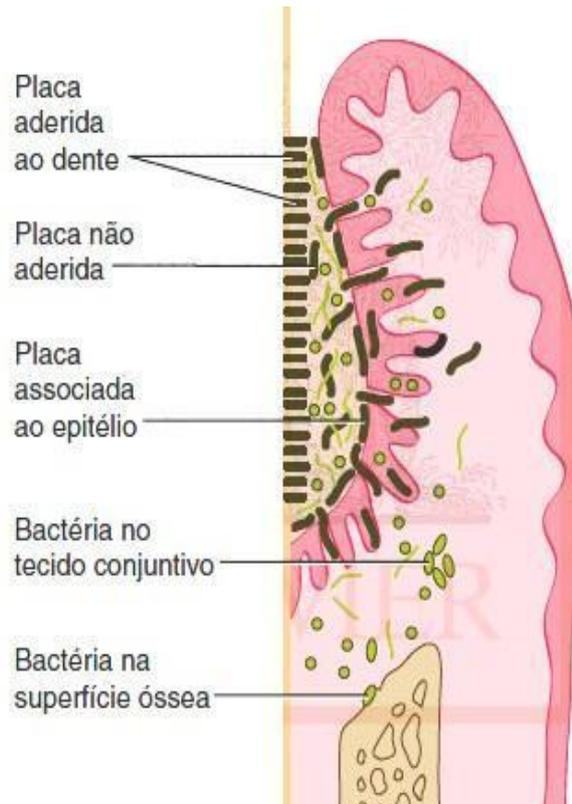
Através de novas técnicas de biologia molecular para a identificação microbiana, mais de 500 fenótipos podem ser encontrados na placa dental. As bactérias associadas à doença periodontal residem dentro do biofilme coronariamente e apicalmente à margem gengival, sendo denominados, respectivamente de placas supra e subgengival (KEIJSER et al., 2008).

A placa supragengival encontra-se na margem gengival ou acima desta. Na fase inicial de formação desse biofilme há predominância de estreptococos alfa-hemolíticos (grupo *viridans*) e pequena proporção de bacilos Gram-positivos, principalmente *Actinomyces* sp. À medida que a placa supragengival se desenvolve e aumenta em espessura, as condições ambientais favorecem a multiplicação de organismos anaeróbios, com a proliferação de bacilos Gram-negativos; após o terceiro dia de formação do biofilme, espécies anaeróbias facultativas constituem cerca de 25%, e bacilos Gram-negativos anaeróbios compreendem mais de 50% da microbiota da placa supragengival (KEIJSER et al., 2008; DEMLIG et al., 2009; PASICH et al., 2013).

A composição dos biofilmes subgengivais é mais complexa, pois se apresentam associados ao dente e ao tecido epitelial, ambos separados por células planctônicas (Figura 1). O biofilme subgengival se assemelha ao supragengival com relação às bactérias associadas à gengivite sem a formação de bolsas profundas. Quando a bolsa periodontal é formada, há predominância de microrganismos filamentosos, com grandes quantidades de espiroquetas e bactérias flageladas móveis. Essa alteração microbiológica ocorre, principalmente, pela disponibilidade local de produtos sanguíneos e pelo baixo potencial de oxirredução, o que caracteriza como ambiente anaeróbio. A borda apical da placa bacteriana é separada do epitélio juncional por uma camada de leucócitos, e não existe uma matriz intermicrobiana definida entre as bactérias (HOJO et al., 2009; NEWMAN et al., 2011).

O biofilme dental é influenciado por fatores do meio externo, e relaciona-se à formação da película adquirida, que através de peptídeos, proteínas e glicoproteínas provenientes da saliva, fornece superfícies susceptíveis à fixação de bactérias. Os *streptococcus* sp. são colonizadores iniciais ligando-se a proteínas ácidas ricas em prolina e em receptores encontrados na película. Após a colonização inicial por cocos e bastonetes Gram-positivos, cocos e bastonetes Gram-negativos passam a compor o biofilme, seguido pelas fusobactérias e espiroquetas. Esse processo de alteração microbiológica está intimamente relacionado com a produção de substâncias poliméricas extracelulares e alterações na biodisponibilidade de oxigênio (Figura 2) (HUANG, LI, GREGORY, 2011; PASICH et al., 2013).

Figura 1: Representação da associação entre as bactérias da placa subgengival, a superfície dental e os tecidos periodontais (Fonte: NEWMAN et al., 2011).



Muitas bactérias da cavidade oral estão envolvidas com eventos de coagregação e acredita-se que essas interações tenham um papel importante na adesão e colonização bacterianas às superfícies dentais. A coagregação ocorre a partir de interações diretas altamente específicas entre receptores e adesinas como lectinas. Interações bem caracterizadas de colonizadores secundários com colonizadores primários incluem a coagregação de *Fusobarium nucleatum* e *Streptococcus* sp. Nas fases tardias há predomínio de coagregação entre diferentes espécies Gram-negativas, como de *F. nucleatum* com *Porphyromonas ginigivalis*, *Prevotella intermedia*, *Tannerella forsythia* e *Treponema denticola* (STOODLEY et al., 2002; KAPLAN et al., 2009; ZIJNGE et al., 2010).

## 2. Expressão de fatores de virulência

---

Apenas uma pequena proporção de bactérias possui adesinas capazes de interagir com receptores da película, e essas bactérias são, por isso, denominadas de colonizadores iniciais. Nesse aspecto, nota-se a importância das bactérias do grupo dos estreptococos orais, que possuem muitos receptores na película formada sobre o esmalte dental, como a alfa-amilase,



em cepas desse patógeno que podem agir como adesinas específicas (DORKHAN, SVENSATER, DAVIES, 2013).

Os estreptococos membros dos grupos mitis e viridans são os colonizadores primários da placa dentária. *S. oralis*, *S. parasanguinis*, e *S. gordonii*, representantes desses grupos, são conhecidos por produzirem peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ) em concentrações suficientes para reduzir o crescimento de muitas bactérias orais, incluindo o *S. mutans*, e ao mesmo tempo estimular a liberação de DNA bacteriano, o que suporta a formação de biofilme e facilita a troca de genes entre bactérias (OKAHASHI et al., 2010; OKAHASHI et al., 2011).

Sob condições específicas, a expressão dos fatores de virulência do *S. mutans* e a formação de biofilmes por esse microrganismo na cavidade oral pode ser modulada de duas formas: pelo meio em que o crescimento bacteriano ocorre, bem como pela presença de outros microrganismos. Cultivar cepas de *S. mutans* sob condições aeróbicas induz uma redução de 80% na capacidade de formação de biofilmes, pois nestas condições ocorre um aumento na expressão gênica do *SMu0629* que desencadeia um excesso de produção de autolisinas, enzimas que inibem a formação do biofilme (AHN et al., 2008; WEN et al., 2011).

As interações entre os microrganismos que colonizam a cavidade bucal são os principais fatores que afetam o desenvolvimento consecutivo do *S. mutans*. Nota-se que *S. salivarius* pode sintetizar exo-beta-D-frutose 6-fosforilase que inibe a síntese de polissacarídeos e reduz a quantidade de matriz extracelular produzida por *S. mutans* (OGAWA et al., 2011).

Essa interação pode ser observada entre o *S. sanguinis* que produz  $H_2O_2$ , o qual interfere no metabolismo do *S. mutans*, que por conseguinte produz bacteriocinas, havendo um efeito inibidor pela produção de toxinas para ambas as espécies. Entretanto, em estudos que desenvolveram biofilme *in vitro* quando ambos os patógenos foram inoculados simultaneamente não conseguiram produzir estas substâncias e não observou-se nenhuma exclusão competitiva, e ambas as espécies participaram da formação da placa dental (KRETH et al, 2005).

O  $H_2O_2$  produzido principalmente por *S. oralis* e *S. sanguinis* pode induzir a morte celular de macrófagos THP-1, danificando os tecidos do hospedeiro e permitindo que bactérias possam evadir os mecanismos de defesa do organismo. Como os macrófagos são conhecidos por produzirem vários mediadores inflamatórios, o estresse oxidativo desencadeado pelo  $H_2O_2$  tem sido implicado na patogênese de inúmeras doenças inflamatórias, como as doenças periodontais. Além disso, o peróxido produzido por estreptococos orais, principalmente do

grupo do *S. sanguinis* pode agir como uma citotoxina, pois como a membrana celular é permeável ao H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, este pode induzir a peroxidação lipídica e danos a proteínas e ácidos nucléicos (OKAHASHI et al., 2011).

A importância de *Streptococcus* sp. para o desencadeamento de doenças periodontais pode estar relacionado com a produção e detecção de moléculas extracelulares denominadas genericamente de autoindutor-2 (AI-2). Tanto *S. oralis* quanto *S. gordonii* são capazes de produzir AI-2, o que pode alterar o biovolume e a espessura do biofilme, além disso quando há uma maior quantidade dessas moléculas biodisponível pode haver uma maior associação interespecie entre estreptococos orais e patógenos periodontais como o *Porphyromonas gingivalis* (PERIASAMY, KOLENBRANDER, 2009).

No caso do *S. salivarius* estudos têm apontado que estes microrganismos podem ser utilizados como probióticos orais, ou seja, são bactérias comensais benéficas que promovem a manutenção de uma microbiota oral saudável. O *S. salivarius* apresenta níveis de  $1 \times 10^7$  UFC/ml na saliva e em indivíduos imunologicamente competentes não causam infecções. Cepas TOVE-R e M-18 desse microrganismo inibem a adesão de *S. mutans* e *S. sobrinus*; estirpes K12 inibem anaeróbios Gram- negativos como *Prevotella* spp. pela produção bacteriocinas importantes como a BLIS (*Bacterion-Like Inhibitory Substances*), salivacrin A2 e 9 (TOUGHELIS et al., 2007; BONIFAIT, CHANDAD, GRENIER, 2009; WESCOMBE et al., 2012).

Em análises de genoma bacteriano se observou que o *S. salivarius* não apresenta fatores de virulência nem induz toxicidade em linhagens de células orais e sanguíneas, ainda ressalta-se que esse microrganismo pode agir no controle da resposta inflamatória mediada por periodontopatógenos. Na avaliação do impacto sobre a expressão de citocinas pró-inflamatórias induzidas por *P. gingivalis* e *A. actinomycetemcomitans* sobre fibroblastos gengivais em estudos *in vitro*, observou-se que cepas M18 e K12 inibiram significativamente a expressão de interleucinas 6 e 8 (BURTON et., 2006; FISCHER, BORGNAKKE, TAYLOR, 2010; ADAM et al., 2011).

## 2.2 Periodontopatógenos.

---

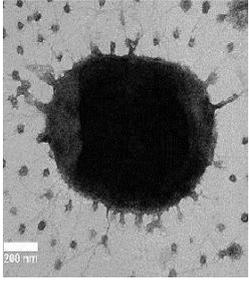
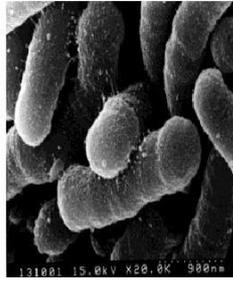
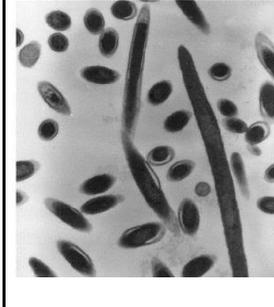
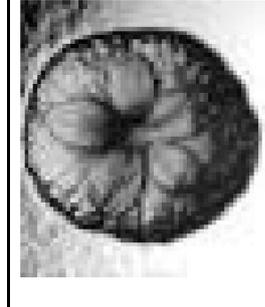
Microrganismos podem ser considerados como agentes causadores de infecção de acordo com os seguintes critérios:

1. Estar associado a uma doença, evidenciado pelo aumento no número de patógenos nos locais doentes.
2. Estar ausente ou reduzido nos locais que demonstrem resolução clínica da doença submetida ao tratamento.
3. Induzir uma resposta no hospedeiro, na forma de uma alteração celular ou resposta imune humoral.
4. Ser capaz de causar doença em modelos de animais experimentais.
5. Demonstrar fatores de virulência responsáveis por permitir ao microrganismo causar destruição dos tecidos do hospedeiro.

Adotando-se esses critérios podemos mencionar as seguintes bactérias relacionadas com as doenças periodontais, sendo denominadas, portanto, de periodontopatógenos:

*Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, *Porphyromonas gingivalis*, *Campylobacter rectus*, *Fusobacterium nucleatum*, *Treponema denticola* e *Prevotella intermedia* (Quadro 1) (SOCRANSKI, HAFFAJEE, 1992; SOCRANSKI, SMITH, HAFFAJEE, 2002; PASICH et al., 2013).

Quadro 1: Classificação filogenética dos periodontopatógenos que foram avaliados nesta pesquisa.

<b>Bactérias</b>				
<b>Filo</b>	<i>Bacteroidetes</i>	<i>Bacteroidetes</i>	<i>Fusobacteria</i>	<i>Proteobacteria</i>
<b>Ordem</b>	<i>Bacteroidales</i>	<i>Bacteroidales</i>	<i>Fusobacteroidales</i>	<i>Pasteurellales</i>
<b>Família</b>	<i>Porphyromonadaceae</i>	<i>Prevotellaceae</i>	<i>Fusobacteriaceae</i>	<i>Pasteurellaceae</i>
<b>Metabolismo</b>	<i>Anaeróbio Restrito</i>	<i>Anaeróbio Restrito</i>	<i>Anaeróbio Restrito</i>	<i>Anaeróbio Facultativo</i>
<b>Motilidade</b>	<i>Móvel</i>	<i>Móvel</i>	<i>Não móvel</i>	<i>Não móvel</i>
<b>Espécie</b>	<i>Porphyromonas gingivalis</i>	<i>Prevotella intermedia</i>	<i>Fusobacterium nucleatum</i>	<i>Aggregatibacter actinomycetemcomitans</i>

O biofilme presente no sulco subgingival, entre o dente e a gengiva, eventualmente desencadeia uma resposta inflamatória no hospedeiro, resultando no aumento da secreção do fluido crevicular. Este fluido protéico pode atuar como fonte de nutrientes para certos organismos, como *P. gingivalis*, *P. intermedia* e *F. nucleatum*, presentes inicialmente em baixas quantidades. A proliferação de tais periodontopatógenos provoca mudanças na comunidade do biofilme que passa a ser dominado por espécies Gram-negativas, proteolíticas e anaeróbias obrigatórias (NEWMAN et al., 2011).

Em relação aos mecanismos de formação do biofilme, o *F. nucleatum* é capaz de se ligar diretamente à película salivar ou de coagregar com estreptococos orais, desempenhando um papel fundamental na criação de um ambiente adequado para os demais periodontopatógenos. O *F. nucleatum* permite a adesão de bactérias importantes como *P. gingivalis* através de

interações bem específicas, mediadas pela adesina-galactose; nesse aspecto as fusobactérias poderiam ser consideradas “bactérias-pontes” (METZGER et al., 2009).

O *F. nucleatum* é um agente patogênico filamentosos que tem a capacidade de aderir e degradar as membranas basais *in vivo* e colágeno tipo IV. Além disso, formam sulfuretos que lhe conferem a habilidade de evadir a resposta imune do hospedeiro, e produzem butirato (sob a forma de ácido butírico) e propionato que inibem a proliferação de fibroblastos gengivais humanos. Proteínas imunossupressoras (FIPs) produzidas por esse microrganismo inibem a resposta das células T humanas, fazendo-as estacionar na fase G1 do ciclo celular, e não permitem a produção de anticorpos com reatividade cruzada com outros microrganismos orais similares. O *F. nucleatum* ainda é relatado como invasor de linhagens de células epiteliais gengivais humanas (HGeC) e capaz de produzir níveis elevados de interleucina-8 (IL-8), uma quimiocina pró-inflamatória (HAN et al, 2000, GEMMEL et al., 2002; SILVA et al., 2005).

Em biofilmes desenvolvidos *in vitro*, apenas com bactérias anaeróbias restritas, tem-se evidenciado que mesmo na ausência de *Streptococcus* sp. podem-se formar biofilmes com a mesma espessura e resistência física daqueles formados na presença de estreptococos. Nestes mesmos biofilmes tem-se demonstrado uma significativa redução da quantidade de *P. gingivalis*, apontando que na ausência de estreptococos orais não ocorre a necessária depleção de oxidantes ambientais para a fixação dessas espécies. Essa é uma importante evidência de que na ausência de *Streptococcus* sp., o *F. nucleatum* pode agir como colonizador inicial e de que ocorre um sinergismo entre estreptococos orais e *P. gingivalis* (JENKINSON, 2011).

As enzimas bacterianas que degradam as proteínas resultam na liberação de amônia que pode ser usada pela bactéria como fonte de nitrogênio. A hemina do ferro proveniente da quebra da hemoglobina do hospedeiro é importante para o metabolismo do *P. gingivalis* e *P. intermedia*. O aumento nos hormônios esteroides está associado a significativos aumentos na proporção de *P. intermedia* na placa subgengival, provocando variações de 2,2% para 10,1%; sugere-se que o estradiol e a progesterona podem substituir a menadiona (vitamina K) como fator de crescimento essencial para *P. intermedia*, mas não para a *P. gingivalis* (SILVA et al., 2013).

As cepas de *P. gingivalis* produzem dois tipos de fímbrias conhecidas como *major e minor fimbriae*, estas interagem com estreptococos orais do biofilme dental facilitando o mecanismo de coagregação, além de se ligarem às proteínas fibronectina e colágeno tipo I da matriz extracelular do hospedeiro. O suporte principal das fímbrias maiores é a cadeia de

subunidades repetidas de proteína 43 kDa FimA, entretanto há uma extensa variação nesse gene e seis diferentes genótipos já foram identificados, evidenciando que apenas as fímbrias com genótipo II e IV estão associadas à periodontite (AMANO et al., 2004; ENERSEN, OLSEN, CAUGANT, 2008; ENERSEN et al., 2008).

Além desses fatores, a produção de proteases tipo-tripsina também caracteriza o *P. gingivalis* como um importante periodontopatógeno. As proteases fornecem nutrição na forma de peptídeos ou aminoácidos para a bactéria que as produz; pelo menos 13 peptidases desse patógeno já foram caracterizadas e enzimas produzidas pelo *P. gingivalis* conhecidas como gingipaínas são responsáveis por pelo menos 85% do total de degradação de proteínas teciduais (NELSON et al., 2003).

Fatores que controlam especificamente a capacidade da bactéria de invadir células epiteliais são fundamentais para sua virulência. No *A. actinomycetemcomitans* foram identificados dois loci, codificados como ApiA e ApiBC, que estão relacionados a proteínas de invasão bacteriana (invasinas). Essa habilidade é influenciada por interações com outros organismos do sulco gengival. Assim, a reinfecção de uma linhagem de células epiteliais por *P. gingivalis* e a coagregação conjunta de uma cepa de *F. nucleatum* resulta em um aumento da invasão por *P. gingivalis* comparando ao controle de uma monocultura. A coagregação com *F. nucleatum* é mediada por polissacarídeos capsulares que podem contribuir indiretamente para a invasão (LI et al., 2004; MOHAMMED et al., 2013).

A complexidade da população microbiana em biofilmes orais, combinada com a diversidade de apresentações clínicas da periodontite, faz a identificação de agentes etiológicos microbianos específicos serem desafiadores. A inclusão do *A. actinomycetemcomitans*, microrganismo anaeróbio facultativo, nesta lista foi baseada em estudos de prevalência em indivíduos saudáveis e com doença periodontal, aliada a técnicas de biologia molecular que apontam a presença de determinantes de virulência e antígenos em bactérias que têm o potencial de promover a doença, bem como a presença ou ausência de anticorpos circulantes em pacientes afetados e em grupos saudáveis (HAUBEK, POULSEN, KILIAN, 2007; NEWMAN et al., 2011).

O *A. actinomycetemcomitans* apresenta antígenos em sua superfície que irão determinar o seu sorotipo, e como há uma heterogeneidade clonal na virulência entre as cepas, destaca-se um tipo clonal particular, sorotipo B, altamente leucotóxico, denominado JP2. Essa bactéria produz a leucotoxina (LtxA) que catalisa a conversão não controlada de adenosina trifosfato

(ATP) para adenosina cíclica monofosfato (cAMP); cepas altamente leucotóxicas detectadas no biofilme periodontal estão associadas à periodontite agressiva localizada (MOMBELI, CASAGNI, MADIAMOS, 2002; HAUBEK, POULSEN, KILIAN, 2007).

Os fatores de virulência relacionados ao *A. actinomycetemcomitans* incluem a presença de fímbrias e adesinas que otimizam o processo de adesão e invasão das células gengivais, vesículas de membrana extracelular, lipopolissacarídeos, a produção de leucotoxinas, de fatores imunossupressores e perturbadores das funções neutrofílicas, da inibição do crescimento de células epiteliais e fibroblastos, além da ativação das células B policlonais. Através desses fatores, esse microrganismo é capaz de invadir e destruir o tecido conjuntivo gengival, penetrando nas barreiras epiteliais e promover a reabsorção óssea e supressão da resposta imune. O *A. actinomycetemcomitans* é a única bactéria oral capaz de produzir uma leucotoxina denominada Cdt (*Cytolethal distening toxin*), que promove alteração morfológica nas células-alvo e é capaz de inibir o crescimento de linfócitos T e B, comprometendo a capacidade do indivíduo de resistir à infecção (LAUBE et al., 2007; GRAVES et al., 2008).

### 3. Respostas inflamatória e imunológica na doença periodontal

---

Os patógenos periodontais são essenciais para o início da doença periodontal, contudo, a extensão e severidade dependem das interações microbiota-hospedeiro. Esse fato implica que o reconhecimento de bactérias não patogênicas/comensais e de bactérias patogênicas envolve mecanismos de vigilância e tolerância, visando estabelecer a resposta apropriada; capaz de prevenir a disseminação da infecção sem induzir uma resposta exarcebada que possa resultar em danos aos tecidos do hospedeiro. O reconhecimento direto dos patógenos é mediado pela detecção de Padrões Moleculares Associados a Microrganismos (MAMPs) pelos receptores de padrões moleculares (PRRs) (BEUTLER 2002; BEUTLER et al., 2003).

Como na cavidade oral ocorrem interações de longa duração entre a microbiota e o hospedeiro resulta numa pré-ativação do sistema imune, representado pela presença comum de células da resposta imune adaptativa nos tecidos periodontais. Várias evidências suportam o papel crucial da resposta imune adaptativa – aspectos humorais e celulares – na mediação da resposta do hospedeiro aos microrganismos presentes no biofilme dental, bem como na

destruição tecidual associada às doenças periodontais (BEKLEN et al., 2008; NEWMAN et al., 2011).

Atualmente admite-se que PRRs reconhecem MAMPs e ativam a resposta imune; células envolvidas na resposta imune inata incluem macrófagos e polimorfonucleares além de células dendríticas e *natural killer* (NK). Estas células reconhecem as MAMPs e respondem com a expressão de moléculas biologicamente ativas, como citocinas e metaloproteases de matriz (MMPs) (DALE, 2002; JI et al., 2007; BEKLEN et al., 2008).

Macrófagos possuem PRRs como receptores tipo Toll (TLR2 e TLR4) e domínios de oligomerização de nucleotídeos (NOD1 e NOD2), que são capazes de reconhecer lipoproteínas, lipopolissacarídeos (LPS), fímbrias e ácido mesodiaminopimérico contendo fragmentos de peptidoglicano de bactérias Gram-negativas como *Treponemas* orais, *P. gingivalis*, *T. forsythia* e *A. actinomycetemcomitans*. A infecção periodontal pelo *P. gingivalis* é mediada por células como fibroblastos, osteoblastos e macrófagos, capazes de produzir citocinas como ligante do receptor-ativador do fator nuclear kB (RANKL). Quando anticorpos anti-RANKL são administrados observa-se uma redução na colonização por esse microrganismo (ONISHI et al., 2008; HAN et al., 2013)

Os macrófagos são células de grandes dimensões do tecido conjuntivo, ricas em lisossomas, que fagocitam antígenos. Essas células derivam dos monócitos do sangue e de células conjuntivas ou endoteliais e possuem duas grandes funções na resposta imunitária: fagocitose e destruição dos microrganismos; e apresentação de antígenos. Expressam numerosos receptores para citocinas pró-inflamatórias; moléculas da parede bacteriana; proteínas do sistema complemento; imunoglobulinas e moléculas de adesão (VERRASTO, 2005; NEWMAN et al., 2011).

Como resposta ao reconhecimento de LPS, DNA contendo CpG e leucotoxinas, os macrófagos produzem os seguintes mediadores biológicos pró-inflamatórios: interleucinas (IL-1 $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-12), fator de necrose tumoral (TNF- $\alpha$ ), MMP-1, NO e prostaglandina E2; podendo atingir concentrações patologicamente elevadas nos tecidos periodontais (FINE et al, 2009).

Então, a partir da ativação de células de defesa, como os macrófagos, MMPs degradam as fibras colágenas, alteram a anatomia normal dos tecidos gengivais e resultam na destruição do ligamento periodontal. A inflamação se estende apicalmente e os osteoclastos são estimulados a reabsorver osso alveolar devido os níveis elevados de interleucinas, principalmente IL-1 $\alpha$  e

IL-6, e TNF- $\alpha$ . A relevância dos macrófagos na resposta imune é evidenciada em estudo que demonstrou que existe co-expressão de macrófagos CD14+CD16+ na gengiva e no sangue periférico de pacientes com periodontite crônica (JAGANNATHAN, LAVU, RAO, 2014).

As elevações nos mediadores pró-inflamatórios ou destrutivos em resposta ao desafio bacteriano são contrabalanceadas pelas elevações nos mediadores anti-inflamatórios ou protetores, tais como as citocinas IL-4 e IL-10, e inibidores teciduais de metaloproteinases (TIMPs). Entretanto, em indivíduos susceptíveis, a produção desses reguladores negativos da imunidade ocorre de forma muito mais lenta, e o processo inflamatório é amplificado (GRAVES, 2008; WENG, FENG, SUN, 2014).

Acrescenta-se o fato de que MMPs como as colagenases apesar de estarem envolvidas com a renovação tecidual, quando produzidas em grande quantidade desempenham papel crucial na degradação do tecido conjuntivo e na reabsorção óssea. Enquanto isso, prostaglandinas E2 agem juntamente com as citocinas sobre os fibroblastos e osteoclastos, que também são levados a produzir MMPs, estimulando ainda mais a perda óssea e de inserção; e o TNF- $\alpha$  mostra efeitos sinérgicos com IL-1, implicando na destruição dos tecidos periodontais (GRAVES, 2008; WENG, FENG, SUN, 2014).

Um estudo de coorte analisou a participação de biomarcadores na predisposição a doenças periodontais, como a periodontite agressiva localizada (PAL). Durante um acompanhamento de 3 anos, pacientes com PAL associada a *A. actinomycetemcomitans*, observou-se que antes de apresentarem reabsorção óssea, foi identificado um elevado nível de MIP-1 $\alpha$  no fluido gengival, detectando-o como uma importante citocina no desenvolvimento da doença periodontal. Esse fato evidencia que esse patógeno pode induzir células fagocitárias, como monócitos e macrófagos, a produzirem grandes quantidades de mediadores inflamatórios. O papel do biofilme no desencadeamento da resposta imune-inflamatória também pode ser observada em estudos que mostram a presença de *A. actinomycetemcomitans* coagregado a *S. parasanguinis* em sítios periodontais, 3-6 meses antes dos eventos de reabsorção óssea na crista alveolar serem notados (FINE et al., 2013; FINE et al., 2014).

#### 4. Controle químico do biofilme dental

---

O tratamento convencional das doenças periodontais constitui-se, prioritariamente, de meticulosa raspagem e alisamento corono-radicular (RACR) acompanhada de orientações de higiene bucal. Entretanto, devido à complexidade da anatomia radicular, e a capacidade de alguns patógenos invadirem os tecidos periodontais, nichos de microrganismos podem persistir, permitindo a formação de bolsas persistentes e/ou refratárias ao tratamento. Por isso, agentes químicos podem ser utilizados, de forma tópica ou sistêmica, com ação antimicrobiana e/ou imunomoduladora. Então, embora apenas a RACR melhore suficientemente as condições clínicas, agentes antimicrobianos, adjuvantes à terapia convencional, podem melhorar o efeito da terapia estabelecida (SOUZA, ABREU, 2003; MONTEIRO, MOREIRA, 2011).

Antibióticos podem ser administrados localmente ou sistematicamente por via oral. A administração sistêmica de antibióticos é uma medida coadjuvante necessária, devido a habilidade de alguns patógenos invadirem os tecidos gengivais adjacentes à lesão. A administração de antimicrobianos de ação sistêmica demonstrou que concentrações terapêuticas são alcançadas no sítio da infecção por curtos períodos de tempo após uma dose simples. No entanto, ela não pode ser utilizada por um longo período de tempo, atingem baixas concentrações no interior da bolsa periodontal e muitos efeitos adversos são relatados, tais como náuseas, vômito, diarreia e gastrite, além de reações alérgicas e o uso desregulado conduz ao desenvolvimento de resistência bacteriana (JORGENSEN, SLOTS, 2000; AAP, 2004; ADA, 2004).

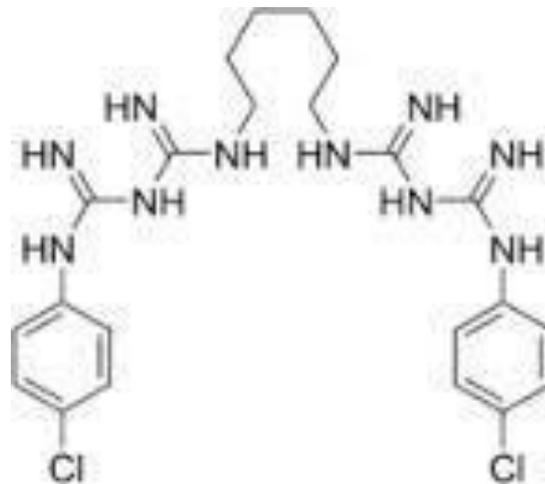
A utilização de fármacos intrabolsa periodontal, uma categoria especial de liberação local na cavidade oral, pode ser utilizada no tratamento de doenças periodontais, sendo uma alternativa para minimizar a absorção sistêmica e, por conseguinte, aumentar a sua concentração no local e diminuir os efeitos adversos indesejáveis. Bochechos, irrigações e jatos pulsáteis, também podem ser utilizados, mas não penetram além de 1 a 2 mm abaixo da margem gengival. O tempo de permanência de soluções de agentes antibacterianos diretamente no interior da bolsa periodontal é curto, mesmo utilizando dispositivos de irrigação adequados, portanto, administrações frequentes são requeridas para a manutenção das concentrações na bolsa (AAP, 2006; NEWMAN et al., 2011).

Antibacterianos tópicos/locais podem ser disponibilizados em vários veículos como enxaguatórios bucais, dentifrícios, géis, vernizes, gomas-de-mascar, pastilhas e dispositivos de

liberação prolongada intra-bolsa. Estes agentes apresentam princípios ativos como digluconato de clorexidina, cloreto de cetilpiridínico e triclosan, que podem ser utilizados de forma profilática ou terapêutica. Entretanto, apresentam efeitos colaterais como manchas nos dentes, perda de paladar, e o uso prolongado destes antissépticos têm sido associados com desequilíbrios na microbiota comensal e, conseqüentemente, com infecções oportunistas (MONTEIRO, MOREIRA, 2011).

A clorexidina é um agente catiônico, uma bis-guanida não-tóxica, sendo uma molécula simétrica, com dois anéis 4-clorofenil e dois grupos etano-pentânicos ligados por uma cadeia central de hexametileno. É preparada sob a forma de diversos sais - gluconato, digluconato e acetato. O digluconato de clorexidina é um dos sais mais empregados na preparação de formulações terapêuticas, pois apresentam maior solubilidade em água, e em pH fisiológico dissocia-se liberando o princípio ativo (DENTON, 2001).

Figura 3: Fórmula estrutural do gluconato de clorexidina.



O mecanismo de ação da clorexidina inicia-se com a ligação na parede celular da bactéria, quando a adsorção das cargas positivas da molécula da substância às cargas negativas das superfícies bacterianas aumenta a permeabilidade da parede celular do microrganismo e permite que o agente penetre no citoplasma, ocorrendo o rompimento da membrana celular e extravasamento dos componentes intracelulares de baixo peso molecular, como íons potássio. Em concentrações de 0,12% a 0,2%, acarretam inibição enzimática (ATPases), extravasamento de macromoléculas (nucleotídeos) e coagulação dos componentes do citoplasma, em razão da

interação da clorexidina com proteínas citoplasmáticas e ácidos nucléicos, tendo ação bactericida e irreversível (SOUZA, ABREU, 2003; BONACORSI, DEVIENNE, RADI, 2000).

Muitos estudos apontam que além dessas substâncias sintéticas, existem grandes perspectivas terapêuticas na utilização de fitoterápicos no tratamento das doenças periodontais. Soluções fitoterápicas utilizadas como substâncias irrigadoras subgingivais e enxaguatórios bucais, quando foram utilizadas no tratamento da periodontite melhoraram significativamente a saúde periodontal dos pacientes, em relação a grupos-controles tratados com clorexidina. O sinergismo entre moléculas estruturais diversificadas e complexas, como terpenoides, glicosídeos, flavonoides e polifenóis, com antibióticos sintéticos, podem estar relacionados com a efetividade antimicrobiana das plantas medicinais no controle do biofilme dental e, conseqüentemente, na melhora dos índices periodontais (VINAGRE et al., 2011; HEMAISWARYA, KRUTHIVENTI, DOBLE, 2008; WAGNER, ULRICH-MERZENICH, 2009).

## 5. Aplicações terapêuticas da fitoterapia na periodontia

---

No âmbito da pesquisa em fitoterapia na odontologia, muitos estudos que investigam a atividade de plantas medicinais tradicionais contra patógenos orais têm sido limitados a avaliação de extratos brutos com solventes orgânicos, muitas vezes simplesmente validando o uso medicinal tradicional da planta. Os ensaios que foram usados para testar as propriedades antimicrobianas de extratos de plantas medicinais envolvem a avaliação da capacidade do material vegetal de inibir o crescimento de organismos patogênicos típicos, tais como *Streptococcus* sp. e *P. gingivalis*. Esses estudos estabeleceram claramente que muitas plantas medicinais têm potencial para serem utilizadas na indústria de produtos odontológicos, dada a sua atividade contra bactérias associadas à cárie dentária e às doenças periodontais (AMADI et al, 2007; RAMAKRISHNA et al, 2011; HERNÁNDEZ et al, 2012; BONIFAIT et al, 2012).

O uso de fitoterápicos com finalidade profilática, curativa, paliativa ou com fins de diagnóstico passou a ser oficialmente reconhecido pela Organização Mundial de Saúde (OMS) em 1978, quando recomendou a difusão mundial dos conhecimentos necessários para o seu uso. Considerando-se as plantas medicinais importantes instrumentos da assistência farmacêutica,

várias resoluções da OMS expressam a posição do organismo a respeito da necessidade de valorizar o uso desses medicamentos, no âmbito sanitário. Sabe-se que 80% da população mundial dependem das práticas tradicionais no que se refere à atenção primária à saúde, e 85 % dessa parcela utiliza plantas ou preparações à base de vegetais. Ressalta-se ainda, que 67 % das espécies vegetais medicinais do mundo são originadas dos países em desenvolvimento (WHO, 2000; BRASIL, 2008;).

No Brasil, o mais recente instrumento de normatização produzido para orientar e potencializar as iniciativas de saúde é a Política Nacional de Práticas Integrativas e Complementares (PNPIC) do Sistema Único de Saúde (SUS), pactuada na Comissão Intergestores Tripartite e aprovada pelo Conselho Nacional de Saúde. A PNPIC define a Fitoterapia como uma terapêutica caracterizada pelo uso de plantas medicinais em suas diferentes formas farmacêuticas, sem a utilização de substâncias ativas isoladas, ainda que de origem vegetal. E ainda destaca o apoio a projetos em pesquisas de bioprodutos com fins terapêuticos em seres humanos, priorizando a biodiversidade brasileira, em que estão contempladas as espécies vegetais medicinais do semi-árido (BRASIL, 2008).

Um fator primordial na pesquisa com fitoterápicos é a realização de um estudo etnobotânico prévio, representando este um resgate junto às comunidades tradicionais acerca das principais formas e indicações terapêuticas na utilização das plantas medicinais pelo conhecimento popular. Em seguida, a próxima etapa seria a definição da espécie vegetal a ser estudada, seguida da coleta de um espécime da planta, preparação da exsicata, identificação botânica e registro em herbário. Na segunda etapa de coleta, destinada ao estudo fitoquímico - o qual compreende as etapas de isolamento, elucidação estrutural e identificação dos constituintes mais importantes do vegetal, principalmente de substâncias originárias do metabolismo secundário, responsáveis pela ação biológica - seleciona-se a parte da planta que será investigada. Posteriormente são realizados ensaios de atividade biológica para investigar as atividades farmacológicas e toxicológicas das substâncias isoladas, das frações obtidas ou extratos totais do vegetal (TOLEDO et al., 2003; MACIEL, PINTO, VEIGA, 2002).

Alguns estudos têm enfatizado grandes perspectivas para a utilização de fitoterápicos no controle de microorganismos presentes na cavidade oral. Na avaliação *in vitro* da atividade antimicrobiana, pelos métodos de difusão em ágar e microdiluição, extratos hidroalcoólicos de *Acanthospermum hispidum*, *Annona coriacea* L., *Hyptis mutabilis* Briq., *Ximenia americana*, *Schinopsis brasiliensis*, além de *Myrciaria cauliflora* (Mart.) O. Berg têm apresentado atividade bactericida e/ou bacteriostática sobre microorganismos do biofilme observando

excelente atividade desses extratos no controle do biofilme (MACEDO-COSTA et al., 2009; SILVA et al., 2013).

Óleos essenciais (OEs) como timol, eucaliptol e mentol, demonstraram capacidade de reduzir o biofilme pré-formado e retardar, em ensaios clínicos, o desenvolvimento da placa existente e, conseqüentemente, da gengivite. Os OEs são formados por compostos aromáticos, obtidos por hidrodestilação de plantas, que evaporam quando expostos à temperatura ambiente, o que explica o termo “óleos voláteis ou etéreos”. Ensaios *in vitro* mostraram que em altas concentrações promovem ruptura da parede celular e precipitação de enzimas essenciais, sugerindo que têm maior efetividade sobre bactérias Gram-positivas; e ensaios clínicos mostraram que OEs incorporados à dentifrícios agem sobre periodontopatógenos associados ao biofilme subgengival. Dentifrícios e enxaguatórios contendo OEs obtiveram selo de aceitação da *American Dental Association* (ADA) (SEYMOUR, 2003; FINE et al., 2007).

A aplicação de fitoterápicos no tratamento das doenças periodontais evidencia que plantas medicinais são fontes de muitos fitocompostos, e que os seus mecanismos de ação ainda precisam ser elucidados para tornar os resultados das pesquisas publicadas, mais consistentes. Em um modelo de periodontite induzida por ligadura, em ratos, através da inoculação de *A. actinomycetencomitans*, *T. forsythia* e *P. gingivalis*, óleos essenciais de *Cordia verbenaceae*, reduziram a quantidade de citocinas pró-inflamatórias, a reabsorção óssea alveolar e a contagem de *P. gingivalis*. Extratos orgânicos de *Hypericum perforatum* também foram eficazes em modelos animais e reduziram a quantidade de células inflamatórias ativadas, a produção de citocinas e a ativação de enzimas polimerases, responsáveis pela ativação da apoptose e por aumentar as lesões aos tecidos muco-gengivais (PATERNITI et al., 2010; RIBEIRO et al., 2012;).

Na avaliação da atividade antimicrobiana de *Croton campestris* sobre patógenos orais como *S. mutans* e *A. actinomycetencomitans*, concluiu-se que as frações hexânica, butânica e etanólica têm efetividade *in vitro*. Estes resultados sugerem que outras plantas pertencentes ao gênero *Croton* sp. podem ser importantes alternativas terapêuticas às doenças periodontais (PEREIRA et al., 2011).

### 5.1. *Croton blanchetianus* Baill.

---

Estudos etnobotânicos apontam que plantas pertencentes à família Euphorbiaceae, como *Croton* sp, são utilizadas por comunidades do interior do nordeste brasileiro com fins terapêuticos e profiláticos que incluem: úlcera gástrica, expectorante, estomatite, inflamações, reumatismo, bronquite, sinusite, diarreia e diabetes. O *Croton blanchetianus* Baill é uma planta arbustiva, pertencente a esta família e à subfamília Crotonoideae, a qual possui 700 espécies e compõe uma das mais abundantes espécies vegetais do bioma caatinga (ALMEIDA et al, 2010; CARTAXO, SOUZA, ALBUQUERQUE, 2010; ALBUQUERQUE et al., 2007).

A espécie *Croton blanchetianus* Baill (figua 3) pode ser descrita botanicamente como:

“Planta arbustiva, podendo chegar à pequena árvore. Apresenta ramos, pecíolos, racemos e na página inferior das folhas, delicado indumento de pelos estrelados de cor acinzentada, às vezes com brilho vítreo, densamente tomentoso e não lepdoto. Os ramos são quase cilíndricos, apresentando sua secção transversal elítica. As folhas medem cerca de 10 a 14 cm de comprimento por 5 a 7 cm de largura na parte mais inferior são triangular-ovais ou quase triangular-lanceoladas, de ápice acentuadamente acuminado e levemente cordato na base, glandulosas, peninervias, com 4 a 6 nervuras secundárias que se aproximam da base, apresentando estípulas cetáceas, alongadas, levemente lacinadas. O pecíolo é 4 a 5 vezes mais curto que o limbo. Os racemos possuem flores abundantes com brácteas linear-lanceoladas cada uma com uma flor. A flor feminina destituída de pétalas apresenta cálice pentafendido, com lobos orbicular-ovais, obtusos, ondulados nas margens e acrescente superando quase a metade da cápsula. Os lacínios subsaccato-reflexos apresentam sinuosidades. O ovário é viloso-tomentoso. As cápsulas medem cerca de 7 mm de comprimento, são depresso-globosas e as sementes 5 mm de comprimento por 4 mm de largura e aproximadamente 2 mm de espessura”

(SILVEIRA, 1979).

Essa espécie, antes denominada de *Croton sonderianus* Muell, é exclusivamente brasileira, ocorrendo em vegetação de carrasco (Ceará) e de caatinga, sendo popularmente conhecida como marmeleiro. Na medicina popular cascas e folhas de *C. blanchetianus* são utilizadas por decocção e infusão em distúrbios estomacais e intestinais, hemorragia uterina, hemoptise, e diarreia. (FRANCO, BARROS, 2006; CARTAXO, SOUZA, ALBUQUERQUE, 2010).

Com o intuito de validar o conhecimento popular, estudos laboratoriais também têm investigado essa euforbiácea. Estudos *in vitro* demonstraram que diterpenos derivados de ácidos beyerenóico e secotracilobanóico, foram isolados de *C. blanchetianus* e apresentaram

atividade antimicrobiana sobre microorganismos como *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Candida albicans* (McCHESNEY, CLARK, SILVEIRA, 1991; McCHESNEY, CLARK, SILVEIRA, 1991).

Figura 4: *Croton blanchetianus* Baill. (Fonte: Emmanuel Albuquerque de Souza)



Atividades biológicas foram investigadas utilizando tanto OEs, como extratos ou frações, principalmente as constituídas de alcalóides e compostos fenólicos. OEs foram identificados em espécies de *C. blanchetianus* apresentando atividade antinociceptiva, anti-inflamatória, e antioxidante. Entretanto, nenhum estudo investigou a atividade antimicrobiana de extratos ou óleos essenciais desse fitoterápico sobre bactérias do biofilme dental, assim como não há nenhum relato de toxicidade aguda ou citotoxicidade (SANTOS et al., 2005).

Resultados sugerem que OEs extraídos das folhas de *C. blanchetianus* possuem caráter antinociceptivo. Em testes em ratos com ácido acético intra-peritoneal e formalina, concluiu-se que este efeito possivelmente estaria relacionado à canais de potássio sensíveis à glibenclamida, necessitando de modelos mais específicos para elucidação. Nessa mesma análise identificou-se

através de Cromatografia Gasosa acoplada à Espectrometria de Massas (CG-EM), um importante método na identificação de compostos presentes em óleos essenciais, 11 compostos majoritários, dentre eles podem ser citados: biciclogermacreno (10,2%), ciscalameneno (10,8%) e guiazuleno (8,3%) (SANTOS et al., 2005).

## 6. Caracterização química de fitoterápicos através de métodos cromatográficos.

---

A cromatografia compreende um grupo diversificado e importante de métodos que permitem a separação, e quando associados a outras técnicas permitem a identificação e quantificação de componentes muito semelhantes de misturas complexas. Nas separações cromatográficas, a amostra é transportada por uma fase móvel, sendo forçada a passar através de uma fase estacionária imiscível fixa colocada em uma coluna ou sobre uma superfície sólida. Os componentes que são retidos mais fortemente na fase estacionária movem-se mais lentamente no fluxo da fase móvel. Ao contrário, os componentes que interagem mais fracamente com a fase estacionária movem-se mais rapidamente. Como consequência dessas velocidades de migração diferentes, os componentes da amostra são separados em bandas ou zonas discretas, que podem ser analisadas qualitativa e/ou quantitativamente (HARRIS, 2012; HOLLER, 2009).

De acordo com a fase móvel utilizada podemos identificar os seguintes métodos cromatográficos: cromatografia gasosa (CG), cromatografia líquida (CL) e cromatografia com fluido supercrítico (CFS). Se um detector, que responde à concentração do soluto, for posicionado no final da coluna, seu sinal será registrado em função do tempo, obtendo-se uma série de picos, denominado cromatograma. Este gráfico é útil na análise química das misturas: as posições dos picos no eixo do tempo podem ser usadas para identificar os componentes da amostra e as áreas sob os picos fornecem uma medida da quantidade de cada um dos componentes (MENDHAM et al., 2002).

### 6.1. Cromatografia Gasosa

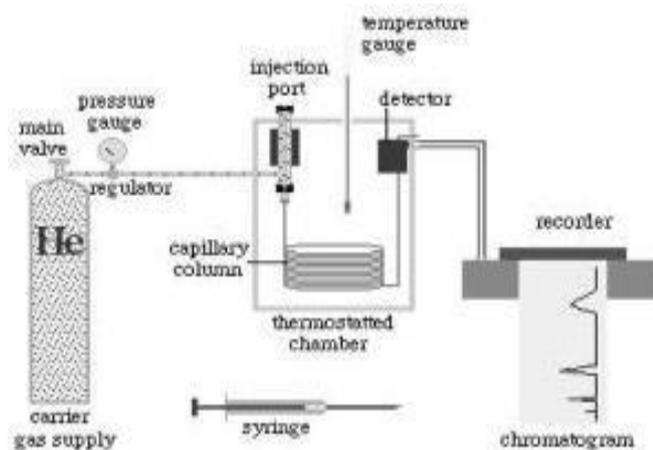
---

Existem dois tipos de cromatografia gasosa: cromatografia gás-líquido (CG) e cromatografia gás-sólido (CGS). A CGS baseia-se em uma fase estacionária sólida, na qual a

retenção dos analitos ocorre devido à adsorção física. Na CG o analito é distribuído entre uma fase móvel gasosa e uma fase líquida imobilizada na superfície de um suporte sólido e inerte ou nas paredes de um tubo capilar (HOLLER, 2009; PAVIA et al., 2006).

A fase móvel em cromatografia gasosa é dominada gás de arraste e deve ser quimicamente inerte. O hélio é a fase móvel gasosa mais comumente usada, embora argônio, nitrogênio e hidrogênio sejam também empregados. Esses gases estão disponíveis em cilindros pressurizados. Reguladores de pressão, manômetros e medidores de vazão são necessários para controlar a vazão do gás. Além disso, o sistema de gás de arraste frequentemente contém uma peneira molecular para remover água e outras impurezas (COLLINS, BRAGA, BONATO, 2006; HARRIS, 2012).

Figura 5: Esquema de um cromatógrafo à gás acoplado a um espectrômetro de massas. (Fonte: Chiaradia et al., 2008).



Na CG é possível separar misturas complexas contendo até 200 compostos muito semelhantes, em pequenas quantidades de amostras. Entretanto, essa técnica tem suas limitações, pois a amostra a ser analisada deve ser volátil, ou possível de volatilização. As amostras podem ser injetadas nos sistemas de capilares através da técnica de injeção direta com divisão de fluxo, ou sem divisão de fluxo, e através do método de injeção direta na coluna (MENDHAM et al., 2002; COLLINS, BRAGA, BONATO, 2006; HOLLER, 2009).

Muitas amostras, porém, não podem ser injetadas diretamente no cromatógrafo a gás devido à elevada polaridade, à baixa volatilidade ou à instabilidade térmica. Este problema pode ser resolvido com a formação de derivados voláteis, principalmente com o uso de reagentes de silanização, estendendo assim a versatilidade e a utilidade da cromatografia com fase gasosa. O termo silanização corresponde à substituição de um hidrogênio lábil da molécula do analito

por um grupo trimetil-silila, - Si(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub> ou grupo semelhante. Existem alguns reagentes de silanização especiais que podem aumentar a resposta do detector, geralmente incorporando grupos funcionais apropriados para detectores seletivos. Nos casos de extratos vegetais com fitoconstituintes de alto peso molecular o processo de silanização pode ser utilizado no preparo da amostra a ser analisada no CG-EM; utilizando esse processo foi possível identificar a constituição dos polissacarídeos obtidos de *Angelica sinensis*, nessa análise identificou-se compostos, normalmente não voláteis, como galactose, ramnose e ácidos glucurônico e galacturônico (BIERMANN, MCGINNIS, 1990 ; CHEN et al., 2001; MENDHAM et al., 2002; SILVERSTEIN, WEBSTER, KIEMLE, 2007).

A escolha do detector depende de fatores como o nível de concentração e a natureza dos componentes da mistura. Os detectores mais usados na CG são: condutividade térmica, ionização em chama, captura de elétrons, fotoionização, fotométrico de chama, emissão atômica e espectrometria de massas (MENDHAM et al., 2002; HOLLER, 2009; HARRIS, 2012).

A possibilidade de separar misturas complexas, como os diversos fitocompostos presentes em extratos e óleos essenciais de plantas medicinais, identificar os componentes e quantificá-los em uma única operação. Por isso, é uma técnica fundamental para compreensão dos milhares de componentes que estão presentes em fitoterápicos, muitas vezes desconhecidos pela ciência (RODRIGUES et al., 2012; MOTA et al., 2013).

A espectrometria de massas é, essencialmente, uma técnica de ionização e fragmentação de moléculas que geram um espectro segundo a razão massa/carga (m/z) dos fragmentos. Como a maior parte dos íons adquire carga unitária, o espectro seleciona, na prática, as massas e, em teoria, permite a identificação pois funciona como uma impressão digital do composto original. Além de fornecer os pesos atômicos e moleculares, a técnica fornece informações estruturais e permite o estudo da cinética e do mecanismo de reações (HOLLER, 2009; HARRIS, 2012).

Através de CG-EM pode-se identificar e quantificar constituintes de óleos essenciais de diversos vegetais, como *Cordia verbenaceae* DC e *Salvia officinalis*, avaliando o espectro de massas entre 30-450 m/z, e comparando-se o padrão de fragmentação dos íons com bibliotecas como a Wiley-L, através dos índices de retenção (IR) citados na literatura e com padrões internos durante a eluição no cromatograma. Dessa forma, podemos co-relacionar os resultados biológicos com os componentes determinados por CG-EM, o que torna essa caracterização indispensável para fitoterápicos voláteis. Essa técnica pode ser aplicada na identificação e posterior isolamento de constituintes de espécies *Croton* sp. como *C. mauritanus*, *C. megalocarpus*, *C. campestris*, *C. sphaerogynus*, *C. macrostachyus*, *C. bonpladianus*; nas quais

isolou-se o 12 - *O* -decanoíforbol-13-acetato e identificou-se a presença de E-cariofileno, beta-cariofileno, beta-felandreno, mirceno, beta-elemeno, delta-germacreno, borneol, todos relacionados à inúmeros efeitos biológicos (LAN et al., 2012; RODRIGUES et al., 2012, MOTA et al., 2013, RAMOS et al., 2013, RUSSO et al., 2013, CORLAY et al., 2014).

## 7. Caracterização termoanalítica

---

Análise térmica é o termo utilizado para definir um grupo de técnicas por meio das quais propriedades físicas de uma substância e/ou de seus produtos de reação é medida em função da temperatura, enquanto essa substância é submetida a um programa controlado de temperatura sob uma atmosfera específica. Dentre as técnicas termoanalíticas, a termogravimetria/termogravimetria derivada (TG/DTG) e a calorimetria exploratória diferencial (DSC) destacam-se na fitoterapia devido à grande importância adquirida na caracterização da estabilidade térmica de fitofármacos e no estudo de compatibilidade entre fitoterápicos e excipientes farmacêuticos (OZAWA et al., 2000; MATOS, MERCURI, ARAUJO, 2009, FERNANDES et al., 2013)

A DSC é uma técnica na qual se verifica a diferença de energia fornecida a uma amostra (extratos vegetais, por exemplo) e a um material de referência, em função da temperatura, enquanto são submetidos a uma programação controlada de temperatura. A partir dos ensaios realizados por DSC, é possível observar fenômenos físicos e químicos decorrentes da variação de energia ( $E$ ) da amostra em função da razão de aquecimento ( $\beta$ ) aplicada sobre a mesma, tais eventos podem ou não envolver variações de massa. Dentre os principais fenômenos físicos que podem ser detectados por DSC, pode-se citar: fusão, sublimação, vaporização, absorção, adsorção, transições cristalinas, vítrea e magnética (OZAWA, 2000; MENDHAM, 2002).

Na TG avalia-se a variação de massa da amostra (perda ou ganho) em função da temperatura e/ou tempo, enquanto o material é submetido às mesmas condições da DSC. Entretanto também podem evidenciar fenômenos químicos, como reações de decomposição térmica que podem envolver processos oxidativo ou de redução. Para facilitar tais determinações e aumentar a exatidão e precisão da medida, e ainda melhorar a visualização do início e final dos eventos térmicos, pode-se utilizar a curva termogravimétrica derivada (DTG) que é obtida por métodos de diferenciação manual e eletrônica dos dados e sinais da TG. A

curva DTG estabelece novas possibilidades para ensaios quantitativos, visto que a área sob a curva é diretamente proporcional à variação de massa, facilitando, inclusive, a diferenciação de eventos térmicos sobrepostos (ROY, RIGA, ALEXANDER, 2002; MORA, CIRRI, MURA, 2006).

Tanto os resultados por DSC, quanto àqueles obtidos por TG/DTG, podem ser afetados pelas condições experimentais utilizadas e por características inerentes à amostra como: razão de aquecimento, atmosfera do forno, vazão do gás, composição do cadinho, tamanho e forma do forno e sensibilidade do mecanismo de registro. Em relação às características da amostra podemos citar a quantidade utilizada, a granulometria, a condutividade térmica e o empacotamento. Por isso, é necessário que haja uma padronização das condições experimentais e do preparo, para que se garanta a confiabilidade dos resultados e a possibilidade de comparações (BERNAL et al., 2002; IONASHIRO, 2004).

A análise térmica tem sido uma importante ferramenta na área farmacêutica devido à diversidade de informações físicas e químicas, imprescindíveis em muitas etapas do desenvolvimento de produtos e no controle de processos biológicos. No contexto da fitoterapia, extratos vegetais são submetidos a diversas variações térmicas, seja pelos processos de extração dos fitocompostos da matéria vegetal, ou por variações ambientais de armazenamento das amostras que serão submetidas a testes biológicos. Seguem-se, ainda, fenômenos térmicos decorrentes das reações orgânicas inerentes ao processo terapêutico intermediado pelos agentes químicos presentes no fitofármaco (OLIVEIRA, YOSHIDA, GOMES, 2011; FLORES, SINGH, KONG, 2014).

Os produtos oriundos das etapas de decomposição térmica dos fitocompostos avaliados podem ter suas estruturas químicas identificadas associando-se os resultados termoanalíticos com aqueles obtidos por outras técnicas, como a espectrometria de massas. A determinação da estrutura química desses compostos é necessária uma vez que a degradação dos diversos princípios ativos presentes na droga vegetal pode levar à perda parcial ou total da atividade dessa substância, ou, até mesmo, à formação de compostos cuja toxicidade seja mais elevada que a dos constituintes originais (PAN et al., 2006; RAJ et al., 2007).

Em avaliações desse aspecto, análises de TG foram utilizadas para esclarecer mudanças térmicas na curva de congelamento e na transição vítrea de extratos liofilizados de *Punica granatum*. Extratos nebulizados de *Vaccinium myrtillus* foram analisados por métodos termoanalíticos para que se compreendesse que a microencapsulação protéica aumenta a

degradação de compostos fenólicos e a capacidade antioxidante da formulação, e que o armazenamento do extrato deve ser feito ao abrigo da luz, pois tal variável altera o processo de decomposição da amostra e de seus constituintes bioativos (RAWAKI et al., 2013; FLORES, SINGH, KONG, 2014).

Estudos com *Albizia inopinata* utilizaram TG e DSC para avaliar a influência de agentes estabilizantes no processo de secagem por nebulização de extratos dessa planta, concluindo que o uso destes excipientes, como o Aerosil<sup>R</sup>, propicia uma redução no número de fases de decomposição, e o processo de perda de massa, e conseqüentemente de fitoconstituintes, ocorre em temperaturas mais elevadas, quando comparados a extratos nebulizados sem agentes estabilizantes. A variedade de picos encontrados em gráficos de DTG em estudos de extratos vegetais, nebulizados e liofilizados, ocorre devido a grande quantidade de substâncias presentes, além das interações que podem ocorrer entre os constituintes e das impurezas de correntes dos processos de extração (MEDEIROS, MEDEIROS, MACEDO, 2002; FERNANDES et al., 2013).

## REFERÊNCIAS

---

Adams E, Jindal M, Seney S *et al.* Streptococcus *salivarius* K12 and M18 Probiotics Reduce Periodontal Pathogen-Induced Inflammation (IADR Paper 150126). American Association, Alexandria, VA, USA (2011).

Albuquerque UP, Medeiros PN, Almeida ALS, Monteiro JM, Neto EMF Melo JG, Santos JP. Medicinal plants of the caatinga (semi-arid) vegetation of NE Brazil: A quantitative approach. *J Ethnopharmacol* 2007; 114: 325–354.

Ahn SJ, Ahn SJ, Wen ZT, Brady LJ, Burne RA. Characteristics of biofilm formation by *Streptococcus mutans* in the presence of saliva. *Infect Immun* 2008; 76(9): 4259–4268.

Amano A, Nakagawa I, Okahashi N, et al. Variations of *Porphyromonas gingivalis* fimbriae in relation to microbial pathogenesis. *J Periodontal Res* 2004; 39:136.

American Academy of Periodontology, Research, Science and Therapy Committee: Systemic antibiotics in periodontics. *J Periodontol* 2004; 75:1553.

American Dental Association, Council on Scientific Affairs : Combating antibiotic resistance. *J Am Dent Assoc* 2004;135:484

Amadi ES et al. Antimicrobial screening of *Breynia nivosus* and *Ageratum conyzoides* against dental caries organisms. J Biol Sci 2007; 7(2): 354-358.

American Academy of Periodontology Statement on Local Delivery of Sustained or Controlled Release Antimicrobials as Adjunctive therapy in the treatment of Periodontitis. J Periodontol 2006; 77:1458.

Angelopoulou D, Demetzos C, Perdetzoglou D. Biochem Syst Ecol 2002; 30: 189.

Bedran TBL et al. Patógenos Periodontais: Comparação entre Cultura Bacteriana e PCR em Tempo Real para Teste Diagnóstico. Revista Odontológica do Brasil Central 2010; 19(50): 187-191.

Bernal C, Couto AB, Breviglieri ST, Cavalheiro ETG. Influência de alguns parâmetros experimentais nos resultados de análises calorimétricas diferenciais-DSC. Quim Nov 2002; 25(5):849-855.

Beklen A, Hukkanen M, Richardson R, Konttinen YT. Immunohistochemical localization of *Toll-like* receptors 1-10 in periodontitis. Oral Microbiol Immunol 2008; 23:425-431.

Beutler B. Toll-like receptors: how they work and what they do. Curr Opin Hematol 2002; 9:2-10.

Beutler B, Hoebe K, Du X, Ulevitch RJ. How we detect microbes and respond to them: the Toll-like receptors and their transducers. J Leukoc Biol 2003; 74:479-485.

Bidault P, Chandad F, Grenier D. Risk of bacterial resistance associated with systemic antibiotic therapy in periodontology. J Can Dent Assoc 2007; 73(8): 721-725.

Brasil. Ministério da Saúde. Secretaria Executiva. Secretaria de Atenção à Saúde. Política Nacional de Práticas Integrativas e Complementares no SUS (PNPIC). Brasília, 2008. 49p.

Burton JP, Chilcott CN, Moore CJ, Speiser G, Tagg JR. A preliminary study of the effect of probiotic *Streptococcus salivarius* K12 on oral malodour parameters. J Appl Microbiol 2006; 100: 754-764.

Biermann J, McGinnis GD. Analysis of Carbohydrates by GLC and MS. 2 ed. Florida: CRC PrAess, 279p, 1990.

Bonifait L et al. Synthesis and antimicrobial activity of geranyloxy- and farnesyloxy-acetophenone derivatives against oral pathogens. Fitoterapia 2012; 83(6):996-999.

- Bonifait L, Chandad F, Grenier D. Probiotics for oral health: myth or reality? *J Can Dent Assoc* 2009; 75: 585–590.
- Byrne SJ, et al. Progression of chronic periodontitis can be predicted by the levels of *P. gingivalis* and *T. denticola* in supragingival plaque. *Oral Microbiology and Immunology* 2009; 24: 01-09.
- Cartaxo AL, Souza MMA, Albuquerque UP. Medicinal plants with bioprospecting potential used in semi-arid northeastern Brazil. *J Ethnopharmacol* 2010; 131: 326–342.
- Chen R, Wang H, Xu H, Xu G, Chang L. Isolation, purification and determination of polysaccharides X-C-3-III and X-C-3-IV from *Angelica sinensis* (Oliv) Diels. *Zhong Yao Cai* 2001; 24(1): 36-37.
- Chiaradia M, Collins C, Jardim I. O Estado da Arte da Cromatografia Associada à Espectrometria de Massas Acoplada à Espectrometria de Massas na Análise de Compostos Tóxicos em Alimentos. *Quimica Nova* 2008; 31 (3): 623-636.
- Collins CH, Braga G., Bonato PS. Fundamentos de cromatografia. Campinas: Editora da UNICAMP, 2006. 452p.
- Corlay N, delang L, Valenciennes EG, Neyts J, Clerc P, Smadja J, Gueritte F, Leysen PM. Diterpenos Tigliane de *Croton mauritanus* como inibidores da replicação do vírus chikungunya. *Fitoterapia* 2014; 97:87-91.
- Dale BA: Periodontal epithelium. a newly recognized role in health and disease. *Periodontol* 2000 2002; 30: 70-78.
- Davis IJ, Wallis C, Deusch O, Colyer A, Milella L, Loman N, Harris S. A cross-sectional survey of bacterial species in plaque from client owned dogs with healthy gingiva, gingivitis or mild periodontitis. *PLoS One* 2013; 8(12):e83158.
- Darveau RP, Tanner A, Page RC. The microbial challenge in periodontitis. *Periodontol* 2000 1997; 14: 12-32.
- Demlig A, Heuer W, Elter C, Heidenblut T, Bach FW, Schwestka-Polly R, Stesch-Scholz M. Analysis of supra and subgingival long-term biofilm formation of orthodontic bands. *Eur J Orthod* 2009; 31:202-206.
- Denton W, Chlorhexidine In: *Sterilisation and Preservation* 5th Edition, Block SS, eds. Lippincott Williams & Williams, Philadelphia, 2001; 321-36.

Dorkhan M, Svensäter G, Davies JR. Salivary pellicles on titanium and their effect on metabolic activity in *Streptococcus oralis*. *BMC Oral Health* 2013; 13:32. doi: 10.1186/1472-6831-13-32.

Enersen M, Olsen I, Caugant DA. *Genetic diversity of Porphyromonas gingivalis* isolates recovered from single “refractory” periodontitis sites. *Appl Environ Microbiol* 2008; 74: 5817.

Enersen M, Olsen I, Kvalheim O, et al. fimA genotypes and multilocus sequence types of *Porphyromonas gingivalis* from patients with periodontitis. *J Clin Microbiol* 2008; 46:31.

Fernandes FH, Santana CP, Santos RL, Correia LP, Conceição MM, Macedo RO, Medeiros ACD. Thermal characterization of dried extract of medicinal plant by DSC and analytical techniques. *J Therm Anal Calorim* 2013; 113: 443-447.

Fine DH, Markowitz K, Fairlie K, Tischio-Bereski D, Ferrandiz J, et al. A consortium of *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, *Streptococcus parasanguinis* and *Filifactor alocis* is present in sites prior to bone loss in a longitudinal study of localized aggressive periodontitis. *J Clin Microbiol* 2013; 51: 2850–2860.

Fine DH, Markowitz K, Fairlie K, Tischio-Bereski D, Ferrandiz J, Godbole D, Furgang D, Gunsolley J, Best A. Macrophage inflammatory protein-1 $\alpha$  shows predictive value as a risk marker for subjects and sites vulnerable to bone loss in a longitudinal model of aggressive periodontitis. *PLoS One* 2014; 9(6):e98541.

Fine DH, Markowitz K, Furgang D, Goldsmith D, Nittel-ricci D, Charles CH. et al. Effect of rinsing with an essential oil-containing mouthrinse on subgingival periodontopathogens. *J Periodontol* 2007; 78(10):1935-1942.

Fisher MA, Borgnakke WS, Taylor GW. Periodontal disease as a risk marker in coronary heart disease and chronic kidney disease. *Curr. Opin. Nephrol. Hypertens* 2010; 19: 519–526.

Flores FP, Ginh RK, Kong F. Physical and storage properties of spray-dried blueberry pomace extract with whey protein isolate as wall material. *J Food Eng* 2014; 137:1-6.

Gemmell E, Bird PS, Carter, CL, Drysdale KE, Seymour GJ. Effect of *Fusobacterium nucleatum* on the T and B cell responses to *Porphyromonas gingivalis* in a mouse model. *Clinical & Experimental Immunology* 2002; 128(2): 238-244.

Graves DT, Fine D, Teng Y-Ta, Van Dyke TE, Hajishengallis G. The use of rodent models to investigate host-bacteria interactions related to periodontal diseases. *J Clin Periodontol* 2008; 35:89-105.

Graves D. Cytokines that promote periodontal tissue destruction. *J Periodontol* 2008; 79: 1585-1591.

Harokopakis E, Albzreh MH, Haase EM, Scannapieco FA, Hajishengallis G. Inhibition of proinflammatory activities of major periodontal pathogens by aqueous extracts from elder flower (*Sambucus nigra*). *J Periodontol* 2006; 77: 271-279.

Harris DC. Análise química quantitativa. 8ª edição. Rio de Janeiro: LTC, 2012.

Han X, Lin X, Yu X, Lin J, Kawai T, LaRosa KB, Taubman MA. Porphyromonas gingivalis infection-associated periodontal bone resorption is dependent on receptor activator of NF- $\kappa$ B ligand. *Infect Immun*. 2013; 81(5):1502-1509.

Haubek D, Poulsen K, Kilian M. Microevolution and patterns of dissemination of the JP2 clone of *Aggregatibacter (Actinobacillus) actinomycetemcomitans*. *Infect Immun* 2007; 75:3080.

He XS, Xi WY. Oral microbiology: past, present and future. *Int J Oral Sci* 2009; 1:47-58.

Hemaiswarya S, kruthiventi A, Doble M. Synergism between natural products and antibiotic against infectious diseases. *Phytomedicine* 2008; 15(8): 639-652.

Hernández DM et al. Entrachyloban-19-oic acid isolated from *Iostephane heterophylla* as a promising antibacterial agent against *Streptococcus mutans* biofilms. *Fitoterapia* 2012; 83(3): 527-531.

Holt S, Ebersole J. *Porphyromonas gingivalis*, *Treponema denticola*, and *Tannerella forsythia*: the “red complex” a prototype polybacterial pathogenic consortium in periodontitis. *Periodontology* 2000 2005; 38: 72-122.

Hojo K, Nagaoka S, Ohshima T, Maeda N. Bacterial interactions in dental biofilm. *J Dent Res* 2009; 88:982-990.

Holler FJ, Skoog DA, Crouch SR. Princípios de análise instrumental. 6ª edição. Porto Alegre: Bookman, 2009.

Huang R, Li M, Gregory RL. Bacterial interactions in dental biofilm. *Virulence* 2000; 2: 435-444.

- Ionashiro MG. Fundamentos da Termogravimetria, análise térmica diferencial e calorimetria exploratória diferencial. São Paulo: Giz editorial 2004, 82p.
- Jagannathan R, Lavu V, Rao SR. Comparison of the Proportion of Non-Classic (CD14+CD16+) Monocytes/Macrophages in Peripheral Blood and Gingiva of Healthy Individuals and Patients with Chronic Periodontitis. *J Periodontol* 2014; 85(6): 852-858.
- Jakubovics NS, Yassin SA, Rickard AH. Community interactions of oral streptococci. *Adv Appl Microbiol* 2014; 87: 43-110.
- Jenkinson HF. Beyond the oral microbiome. *Environ Microbiol* 2011; 13: 3077-3087
- Ji S, Kim Y, Min BM, Han SH, Choi Y. Innate immune responses of gingival epithelial cells to nonperiodontopathic and periodontopathic bacteria. *J Periodontal Res* 2007; 42:503-510.
- Jorgensen MG, Slots J: Practical antimicrobial periodontal therapy. *Compend Contin Educ Dent* 2000; 21:111.
- Juiz PJJ, Alves RJC, Barros TF. Uso de produtos naturais como coadjuvante no tratamento da doença periodontal. *Brazilian Journal of Pharmacognosy* 2010; 20(1): 134-139.
- Keijsers BJ, Zaura E, Huse SM, et al: Pyrosequencing analysis of the oral microflora of healthy adults. *J Dent Res* 2008; 87:1016.
- Kreth J., Merritt J., Shi W., Qi F. Competition and coexistence between *Streptococcus mutans* and *Streptococcus sanguinis* in the dental biofilm. *J Bacteriol* 2005; 187: 7193–7203.
- Lan M, Wan P, Wang ZY, Huang XL. GC-MS analysis of chemical components in seeds oil from *Croton tiglium*. *Zhong Yao Cai* 2012; 35(7):1105-1108.
- Laube DM, Dongari-Batzoglou A, Kashleva H, Eskdale J, Gallagher G, Diamond G. Differentiation regulation of innate immune response genes in gingival epithelial cells stimulated with *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*. *J Periodontal Res* 2008; 43(1): 116-123.
- Li J, Yu G, Fan J. Alditols and monosaccharides from sorghum vinegar can attenuate platelet aggregation by inhibiting cyclooxygenase-1 and thromboxane-A<sub>2</sub> synthase. *J Ethnopharmacol* 2014; S0378-8741(14): 387-390.
- Macedo-Costa MR et al. Eficácia do extrato de *Myrciaria cauliflora* (Mart.) O Berg (jabuticabeira) sobre bactérias orais. *Rev Bras Farmacog* 2009; 19(2b): 565-571.
- Maciel MAM, Pinto AC, Veiga VF. Plantas medicinais: a necessidade de estudos multidisciplinares. *Química Nova* 2002; 25(3): 429-438.

Matos JR, Mercuri LP, Araujo GLB. Aspectos gerais referentes ao desenvolvimento farmacotécnico de medicamento: análise térmica aplicada a fármacos e medicamentos. In: Storpirtis S, Gonçalves JE, Chiann C, Gai MN. Biofarmacotécnica. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2009, p.32-65.

McChesney JD, Clark AM, Silveira ER. Antimicrobial diterpenes of *Croton sonderianus*. II. ent-Beyer-15-en-18-oic acid. *Pharm Res* 1991; 8(10):1243-1247.

Medeiros ACD, Medeiros IA, Macedo RO. Thermal studies of *Albizia inopinata* crude extract in the presence of cyclodextrin and Aerosil<sup>®</sup> by TG and DSC coupled to the photovisual system. *Thermochim Acta* 2002; 392:93-98.

Mendham J, Denney RC, Thomas M. Vogel: Análise química quantitativa. Rio de Janeiro: editora LTC, 6ª edição, 2002.

Metzger Z, Blasbalg J, Dotan M, Tsisis I, Weiss EI. Characterization of Coaggregation of *Fusobacterium nucleatum* PK1594 with Six *Porphyromonas gingivalis* Strains. *J Endod* 2009; 35(1):50-54.

Mohammed MM, Nerland AH, Al-Haroni M, Bakken V. Characterization of extracellular polymeric matrix, and treatment of *Fusobacterium nucleatum* and *Porphyromonas gingivalis* biofilms with DNase I and proteinase K. *J Oral Microbiol.* 2013; doi: 10.3402/jom.v5i0.20015.

Mombelli A, Casagni F, Madianos PN. Can presence or absence of periodontal pathogens distinguish between subjects with chronic and aggressive periodontitis? A systematic review. *J Clin Periodontol* 2002; 29(Suppl 3):10-14.

Monteiro, L. K. B., & Moreira, M. M. S. M. Uso tópico de antimicrobianos como um meio auxiliar no tratamento da periodontite. *Perionews* 2011, 5(1), 42-49.

Moore WE, Moore LV. The bacteria of periodontal diseases. *Periodontol* 2000 1994; 5:66.

Mora PC, Cirri M, Mura P. Differential scanning calorimetry as a screening technique in compatibility studies of DHEA extended release formulations. *J Pharm Biomed Anal* 2006; 42: 3-10.

Nelson KE, Fleischmann RD, DeBoy RT, et al. Complete genome sequence of the oral pathogenic Bacterium *porphyromonas gingivalis* strain W83. *J Bacteriol* 2003; 185:5591.

- Neumegen RA, Fernández-alba AR, Chisti, Y. Toxicities of triclosan, phenol, and copper sulfate in activated sludge. *Environmental Toxicology* 2005; 20: 160-164.
- Newman MG, Takey HH, Klokkevold PR, Carranza FA. *Periodontia Clínica*. 11ª edição. Rio de Janeiro: Elsevier, 2011.
- Ogawa A, Furukawa S, Fujita S, Mitobe J, Kawarai T et al. Inhibition of *Streptococcus mutans* biofilm formation by *Streptococcus salivarius* FruA. *Appl Environ Microbiol*. 2011; 77 (5):1572–1580.
- Okahashi N, Okinaga T, Sakurai A, Terao Y, Nakata M, et al. *Streptococcus sanguinis* induces foam cell formation and cell death of macrophages in association with production of reactive oxygen species. *FEMS Microbiol Lett* 2011; 323: 164–170.
- Okahashi N, Nakata M, Sakurai A, Terao Y, Hoshino T, et al. Pili of oral *Streptococcus sanguinis* bind to fibronectin and contribute to cell adhesion. *Biochem Biophys Res Commun* 2010; 391: 1192–1196.
- Oliveira MA, Yoshida MI, Gomes ECL. Análise térmica aplicada a fármacos e formulações farmacêuticas na indústria farmacêutica. *Quim Nova* 2011; 34 (7):1224-1230.
- Onishi S, Honma K, Liang S, et al. Toll-like receptor 2-mediated interleukin-8 expression in gingival epithelial cells by the *Tannerella forsythia* leucine-rich repeat protein BspA. *Infect Immun* 2008; 76:198-205.
- Ozawa T. Thermal analysis: review and prospect. *Termochim acta* 2000; 355: 35-42.
- Pan C, Liu F, Ji Q, Wang W, Drin kwater D, Vivilechia R. The use of LC/MS, CG/MS, and LC/NMR hyphenated technique of identify a drug degradation product in pharmaceutical development. *J Pham Biomed Scie* 2006; 40: 584-590.
- Paterniti I, Briguglio E, Mazzon E, Galuppo M, Oteri G, Cordasco G, Cuzzocrea S. Effects of *Hypericum Perforatum*, in a rodent model of periodontitis. *BMC Complement Altern Med* 2010; 23(10)73.
- Pasich E, Walczewska M, Pasich A, Marcinkiewicz J. Mechanism and risk factors of oral biofilm formation *Postepy Hig Med Dosw* 2013;67:736-41
- Pavia, Donald L., Gary M. Lampman, George S. Kritz, Randall G. Engel. *Introduction to Organic Laboratory Techniques* (4th Ed.). [S.l.]: Thomson Brooks/Cole, 2006. 797-817 p
- Pereira SLS, et al. Clinical effect of a mouth rinse containing *Ocimum gratissimum* on plaque and gingivitis control. *The Journal of Contemporary Dental Practice* 2011; 12(5): 350-355.

Pereira EM, Gomes RT, Freire NR, Aguiar EG, Brandão Md, Santos VR. In vitro antimicrobial activity of Brazilian medicinal plant extracts against pathogenic microorganisms of interest to dentistry. *Planta Med* 2011; 77 (4): 401-404.

Periasamy S., Kolenbrander P. E. Mutualistic biofilm communities develop with *Porphyromonas gingivalis* and initial, early, and late colonizers of enamel. *J Bacteriol* 2009; 191:6804–6811.

Pereira EM, Gomes RT, Freire NR, Aguiar EG, Brandão Md, Santos VR. In vitro antimicrobial activity of Brazilian medicinal plant extracts against pathogenic microorganisms of interest to dentistry. *Planta Med* 201; 77(4): 401-414.

Polombo EA, et al. Traditional Medicinal Plant Extracts and Natural Products with Activity against Oral Bacteria: Potential Application in the Prevention and Treatment of Oral Diseases. *Evi Based Complement Altern Med.* 2011. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1093/ecam/nep06>>

Ramakrishna Y, et al. Decreasing cariogenic bacteria with a natural, alternative prevention therapy utilizing phytochemistry (plant extracts). *J Clin Pediatric Dent* 2011; 36(1): 55-63.

Ramos JMO, Santos CA, Santana DG, Santos DA, Alves PB et al. Constituintes químicos e atividade anti-inflamatória potencial do óleo essencial das folhas de *Croton argyrophyllus*. *Rev Brasileira de Farmacognosia* 2013; 23(4): 644-650.

Rawahi A, Rahman MS, Waly M, Guillemin GJ. Thermal characteristics of a water soluble extract obtained from pomegranate skin: Developing a state diagram for determining stability. *Ind Crops Product* 2013; 48: 198-204.

Ribeiro FV, Pimentel SP, Barrella GE, Casarin RC, Cirano FR, Casati MZ, Foglio MA, Figueira GM. Protective effect of topical *Cordia verbenacea* in a rat periodontitis model: immune-inflammatory, antibacterial and morphometric assays. *BMC Complement Altern Med* 2012; 21(12): 220-224.

Roy S, Riga AT, Alexander KS. Experimental design aids the development of a differential scanning calorimetry standard test procedure for pharmaceuticals. *Termochim acta* 2002; 392: 399-404.

Rodrigues FF, Oliveira LG, Rodrigues FF, Saraiva ME, Almeida SC, Cabral ME, Campos AR, Costa JG. Chemical composition, antibacterial and antifungal activities of essential oil from *Cordia verbenacea* DC leaves. *Pharmacognosy Res* 2012; 4(3):161-165.

- Russo A, Formisano C, Rigano D, Senatore F, Delfine S, Cardile V, Rosselli S, Bruno M. Chemical composition and anticancer activity of essential oils of Mediterranean sage (*Salvia officinalis* L.) grown in different environmental conditions. *Food Chem Toxicol* 2013; 55: 42-47.
- Santos FA, Jeferson FA, Santos CC, Silveira ER, Rao VSN. Antinociceptive effect of leaf essential oil from *Croton sonderianus* in mice. *Life Sciencia* 2005; 77: 2953-2963.
- Seymour R. Additional properties and uses of essential oils. *J Clin Periodontol* 2003; 30(Suppl 5): 19-21.
- Silva VL, Diniz CG, Cara DC, Santos SG, Nicoli JR, Carvalho MA, Farias LM. Enhanced pathogenicity of *Fusobacterium nucleatum* adapted to oxidative stress. *Microbial Pathogenesis* 2005: 131-138.
- Silva MSP, et al. Study bioprospecting of medicinal plant extracts of the semiarid northeast: contribution to the control of oral microorganisms. *Evid Based complement Alternat Med* 2013. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1155/2012/681207>>.
- Silverstein RM, Webster FX, Kiemle DJ. Identificação Espectrométrica de Compostos Orgânicos. 7ª ed. Rio de Janeiro: LTC, 488p, 2007.
- Socransky SS, Haffajee AD: The bacterial etiology of destructive periodontal disease: current concepts. *J Periodontol* 1992; 63:322.
- Socransky SS, Smith C, Haffajee AD: Subgingival microbial profiles in refractory periodontal disease. *J Clin Periodontol* 2002; 29: 260.
- Souza RRD, Abreu MHNGD. Análise crítica da indicação da clorexidina no controle da placa bacteriana e doença periodontal. *Arq Odontol* 2003; 39(3), 174-183.
- Stingu CS, Eschrich K, Rodloff AC, et al: Periodontitis is associated with a loss of colonization by *Streptococcus sanguinis*. *J Med Microbiol* 2008; 57:495.
- Stoodley P, Sauer K, Davies DG, Costerton JW. Biofilm as complex differentiated communities. *Ann Rev Microbiol* 2002; 56:187-209.
- Teughels W, Newman MG, Coucke W *et al.* Guiding periodontal pocket recolonization: a proof of concept. *J Den Res* 2007; 86: 1078–1082.
- Toledo ACO, Hirata LL, Buffon MCM, Miguel MD, Miguel OG. Fitoterápicos: uma abordagem farmacotécnica. *Revista Lecta* 2003; 21(1-2): 7-13.

Verrasto, Therezinha, Atheneu, Hematologia e hemoterapia Fundamentos de Morfologia, Fisiologia, Patologia e Clínica, São Paulo: 2005.

Vinagre NPL, Farias CG, Araújo RJG, Vieira JMS, Silva Júnior JOC, Correa AM. Clinical efficacy of a phytoterapeutic mouthrinse with standardized tincture of *Calendula officinalis* in the maintenance of periodontal health. Rev Odontol UNESP 2011; 40(1): 30-35.

Wagner H, Ulrich-Merzenich G. Synergy research: approaching a new generation of phytopharmaceuticals. Phytomedicine 2009; 16(2-3): 97-110.

Wang LQ, Feng K, Sun L. The influences of non-surgical periodontal treatment on gingival crevicular fluid levels of MMP-8 and tissue inhibitor of TIMP-1. Shanghai Kou Qiang Yi Xue 2014; 23(2): 229-32.

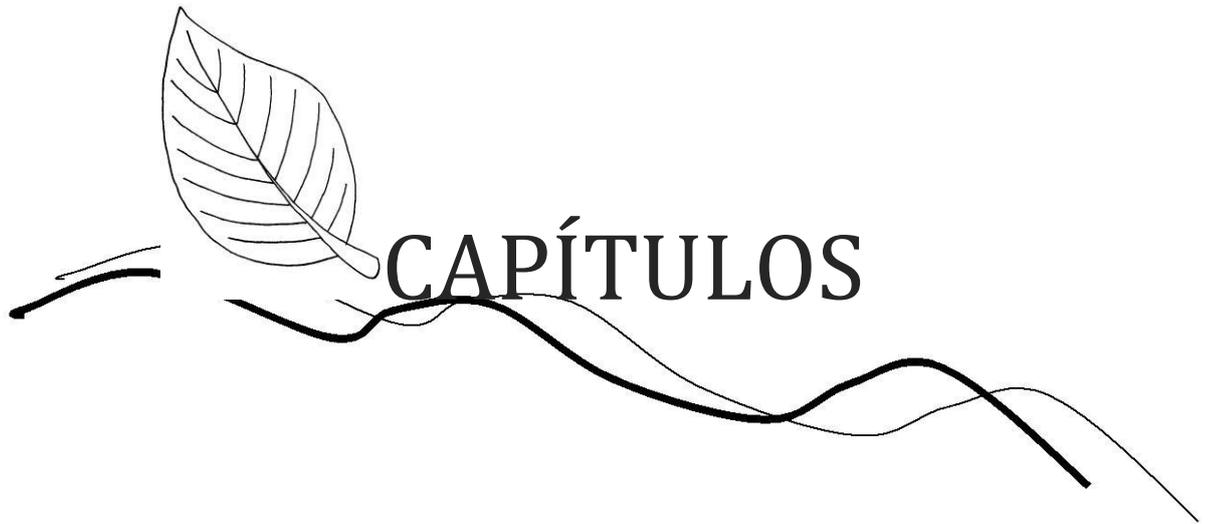
Wen ZT, Yates D, Ahn SJ, Burne RA. Biofilm formation and virulence expression by *Streptococcus mutans* are altered when grown in dual-species model. BMC Microbiol 2011; 10: 108-111.

Wescombe P, Hale JD, Nicholas CK, Heng J. Developing Oral Probiotics From *Streptococcus salivarius*. Future Microbiol 2012; 7(12): 1355-1371.

Wood SR, Kirkham J, Marsh PD, et al: Architecture of intact natural human plaque biofilms studied by confocal laser scanning microscopy. J Dent Res 2000; 79:21.

World Health Organization (WHO). General Guidelines for Methodologies on Research and Evaluation of Traditional Medicine. Geneva, 2000.

Zijngel V, van Leeuwen MB, Degener JE, Abbas F, Thurnheer T, Gmür R, Harmsen HJ. Oral biofilm architecture on natural teeth. PLoS One 2010; 5(2):e9321.



# CAPÍTULOS

## CAPÍTULO I

---

SOUZA, Emmanuel Albuquerque de. **Planejamento experimental na otimização da atividade antibacteriana de extratos de *Croton blanchetianus* Baill.** Campina Grande-PB: UEPB, 2014. 160p.(Dissertação – Mestrado em Odontologia).

### RESUMO

Na triagem da atividade antibacteriana com extratos vegetais, o planejamento fatorial é um importante instrumento para otimizar o efeito biológico almejado, além de prever e propor novas metodologias e variáveis que podem ser inseridas em análises laboratoriais. Esse estudo objetivou otimizar a atividade antibacteriana sobre *Streptococcus* sp de extratos de *Croton blanchetianus* Baill através de planejamento fatorial. Extratos hidroalcoólicos da casca da planta foram obtidos por três métodos extrativos (maceração, ultrassom e turbólise) e em diferentes proporções vegetal: solvente e álcool: água. As Concentrações Inibitórias Mínimas (CIMs) foram obtidas para *S. mutans*, *S. oralis*, *S. parasanguinis* e *S. salivarius*, pelo método da microdiluição. Utilizou-se o modelo de regressão linear e a análise de variância (ANOVA) para determinar as condições das variáveis de obtenção dos extratos que determinaram as menores CIMs. A extração por turbólise reduziu as CIMs de *S. mutans*, *S. oralis* e *S. parasanguinis* em relação aos outros métodos extrativos ( $p < 0,05$ ). O modelo de regressão apresentou falta de ajuste apenas para as CIMs obtidas para *S. mutans* ( $p = 0,002$ ). O planejamento experimental mostrou que o método extrativo por turbólise, as concentrações de 0,14 g/mL de matéria vegetal e a utilização de solventes na proporção álcool: água de 70% apresentaram maior efetividade antibacteriana sobre *Streptococcus* sp.

## 1. INTRODUÇÃO

---

O planejamento experimental, também denominado delineamento experimental, representa um conjunto de ensaios estabelecidos com critérios científicos e estatísticos, com o objetivo de determinar a influência de diversas variáveis nos resultados de um dado sistema ou processo. Neste aspecto, esse procedimento visa determinar quais variáveis são mais influentes nos resultados; atribuir valores às variáveis influentes de modo a otimizar os resultados, minimizar a variabilidade das respostas e reduzir a influência de variáveis incontroláveis (MYLONAKI et al., 2008).

Neste âmbito, os fundamentos estatísticos de análises propiciam a redução do número de ensaios sem prejuízo da qualidade da informação, através dos estudos simultâneos de diversas variáveis, separando seus efeitos; a determinação da confiabilidade dos resultados e a realização da pesquisa em etapas, num processo iterativo de acréscimo de novos ensaios, auxiliando na elaboração de conclusões a partir de resultados qualitativos (SATHIYANARAYANAN et al., 2014; PERETTO et al., 2014).

Nas ciências biológicas, tais experimentos são importantes instrumentos para que se possa otimizar o efeito biológico almejado, além de prever e propor novas metodologias e novas variáveis que podem ser inseridas em análises laboratoriais e em ensaios clínicos. Neste aspecto, alguns estudos têm investigado a atividade antimicrobiana de vários produtos naturais e sintéticos a partir de diversas técnicas de planejamento experimental e análise estatística dos dados. Nesse sentido, o método mais utilizado para avaliar se um modelo construído é adequado ao sistema em avaliação é a análise de variância (ANOVA). (FRANCISCO et al., 2014, PERETTO et al., 2014).

Na determinação da atividade biológica de extratos vegetais, um dos fatores mais importantes é a técnica de extração, a qual tem a finalidade de separar as substâncias de interesse a partir de uma matriz complexa. No processo extrativo deve ser considerada uma série de fatores tais como: agitação do sistema, tempo de contato e método de extração. Alguns estudos mencionam que a variação da temperatura inerente aos processos de agitação ultrassônica, pode interferir na quantidade e qualidade de compostos fenólicos, por exemplo, influenciando diretamente a atividade antioxidante do vegetal. Nestes mesmos estudos, técnicas de planejamento experimental foram utilizadas para comparar processos extrativos convencionais, como a maceração, a outras formas de extração como o ultrassom, visando otimizar as

atividades biológicas dos extratos. (GONZÁLEZ-CENTENO et al., 2014; GONZÁLEZ-CENTENO et al., 2014).

Além do aspecto biológico pesquisas que utilizaram diferentes formas de planejamento experimental, referenciaram que diferentes técnicas de extração como a decocção, ultrassom, micro-ondas, maceração e soxhlet propiciam diferenças na quantidade de terpenoides, flavonoides e diversos outros compostos bioativos. Mas além, dessas variáveis, diferentes solventes também influenciam, significativamente, na concentração de compostos e na atividade antimicrobiana do extrato obtido (ISLA et al., 2014; LIU et al., 2014; SIANI et al., 2014).

Apesar de plantas do gênero *Croton* serem relatadas como fitoterápicos capazes de produzir terpenos e apresentarem atividade antimicrobiana sobre bactérias da cavidade oral, no estado atual da literatura nenhum artigo referenciou alterações nessa atividade biológica decorrentes de variações nos processos extrativos (SÁ et al., 2012). Dessa forma, nessa análise buscou-se avaliar se o método de extração, a concentração do vegetal utilizado durante a técnica extrativa e a proporção hidroalcoólica do solvente podem influenciar na inibição antibacteriana sobre *Streptococcus* sp.

## 2. MATERIAIS E MÉTODOS

---

### 2.1. Coleta e identificação do material vegetal

Amostras da casca da planta foram coletadas no estado da Paraíba, região nordeste do Brasil, na microrregião dos Cariris, no município de Aroeiras, com as seguintes coordenadas, Latitude: 7,543798/7°32'37,67''S e Longitude: -5,746061/35°44'45,82''W. Foram selecionadas espécies adultas com auxílio de um botânico especializado em plantas da caatinga, na estação conhecida como alto verão, que se estende de setembro a fevereiro respeitando-se o horário ideal de coleta. Foram realizadas exsicatas, para identificação e verificação da autenticidade botânica do *Croton blanchetianus* Baill. seguido de depósito, com tombamento nº 4946, no herbário do Centro de Ciências Tecnológicas e Rurais (CCTR) da Universidade Federal de Campina Grande (UFCG).

Após a coleta da planta, as amostras da casca da planta foram colocadas em estufa de circulação de ar, e após a estabilização do peso foram pulverizadas em moinho de facas, obtendo-se partículas de 10 mesh.

## 2.2. Obtenção dos extratos hidroalcoólicos

As soluções hidroalcoólicas foram obtidas por três métodos extrativos:

- Maceração, na qual a matéria vegetal e o solvente permanecem em contato estático por 5 dias;
- Ultrassom, na qual as amostras foram sonicadas durante 1 hora, a  $35 \pm 1$  °C, utilizando o aparelho Unique Ultrasonic Cleaner<sup>®</sup>;
- Turbólise, no qual as amostras foram agitadas durante 15 minutos, a 6000 rpm, no aparelho IKA T10 Turrax<sup>®</sup>.

Os extratos foram obtidos utilizando três diferentes concentrações de matéria vegetal: solvente (em  $\text{g.L}^{-1}$ ) – 0,07, 0,14 e 0,21– e soluções extratoras em três diferentes concentrações álcool:água (em %) – 50, 70 e 90 – obtendo-se, assim, 27 extratos diferentes.

## 2.3. Desenho do estudo

Realizou-se um planejamento experimental com o intuito de avaliar a influência das variáveis utilizadas na obtenção dos extratos na atividade antimicrobiana desses extratos sobre *Streptococcus* sp. Foram avaliados dois tipos de variáveis quanto ao tipo dos dados, sendo a variável qualitativa, método de extração, e as variáveis quantitativas, concentração de material vegetal e proporção hidroalcoólica.

No planejamento experimental adotado foi, inicialmente, analisado qual método extrativo mais influenciava na resposta antimicrobiana, e após a seleção do melhor método extrativo adotou-se um planejamento fatorial completo para otimizar a atividade antimicrobiana e para determinar quais variáveis independentes mais influenciam nesse efeito biológico. Para isso selecionou-se um modelo de ponto central, no qual foram feitas três repetições de cada condição experimental e os ensaios realizados aleatoriamente para minimizar os efeitos de variabilidade nas respostas observadas (Tabela 1).

Tabela 1. Níveis das variáveis utilizadas no planejamento ( $2^2$ ).

Variáveis independentes	-1	0	1
Proporção vegetal : solvente – V/S ( $\text{g.L}^{-1}$ )	0,07	0,14	0,21
Proporção álcool : água – A/A (%)	50	70	90

#### 2.4. Triagem antibacteriana sobre *Streptococcus* sp.

Os extratos hidroalcoólicos de *C.blanchetianus* Baill foram submetidos a uma triagem sobre *Streptococcus* sp, bactérias colonizadoras iniciais do biofilme dental, utilizando cepas padrão *American Type Culture Collection* (ATCC) (Tabela 2).

Tabela 2: Cepas bacterianas utilizadas na triagem microbiológica.

Microrganismos	ATCC
<i>Streptococcus parasanguinis</i>	903
<i>Streptococcus salivarius</i>	7073
<i>Streptococcus oralis</i>	10557
<i>Streptococcus mutans</i>	25175

No ensaio antimicrobiano foi utilizado o método de microdiluição descrito pela *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI, 2005). Os microorganismos foram previamente cultivados em caldo BHI (*Brain Heart Infusion*), em condições microaerófilas, numa jarra de anaerobiose, a  $37 \pm 0,5$  °C por 18h. Após esse período de incubação, com o auxílio de uma alça de platina, os microorganismos foram plaqueados em BHI ágar, suplementado com 5% de sangue de carneiro desfibrinado, em jarra de anaerobiose, 37 °C, por 24h. Depois desse período, observou-se o crescimento bacteriano, e cerca de 5 - 10 colônias isoladas dos microorganismos foram transferidos para 10 mL de BHI caldo, a  $37 \pm 0,5$  °C por 18h. Em seguida, o inóculo foi padronizado utilizando espectrofotômetro, Biospectro<sup>®</sup>, com comprimento de onda de 625 nm,

a fim de se obter um inóculo de  $1,5 \times 10^8$  UFC.mL<sup>-1</sup>, após isso foram realizadas diluições seriadas até que se atingisse  $1,0 \times 10^6$  UFC.mL<sup>-1</sup>.

Numa microplaca de 96 poços, procedeu-se com a microdiluição, foram plaqueados 100 µL de meio BHI caldo; 100 µL das soluções-testes de extratos hidroalcoólicos em oito diluições seriadas nos poços das respectivas colunas da microplaca; e 100 µL do inóculo bacteriano. Os solventes foram utilizados como controle negativo, e digluconato de clorexidina (Sigma Aldrich®) a 0,12% como controle positivo. Os testes foram realizados em triplicata, em três momentos distintos, e as microplacas foram incubadas a  $37 \pm 0,5$  °C, por 24h. Após esse período, para determinação da concentração inibitória mínima (CIM) foi adicionado 20 µL de resazurina (Sigma Aldrich®) a 0,01%, verificando-se a redução colorimétrica do corante para azul nos poços onde não houve presença de bactérias viáveis.

## 2.5. Análise estatística

No planejamento fatorial, inicialmente utilizou-se o ANOVA *One Way* com pós-teste Tukey para avaliar qual seria o método extrativo com melhor ação antimicrobiana. Em seguida, utilizou-se a seguinte função para as variáveis independentes proporção vegetal : solvente (g.L<sup>-1</sup>) e álcool : água (%):

$$Y = \beta_0 + \sum \beta_i x_i + \sum \beta_{ii} x_i^2 + \sum \beta_{ij} x_i x_j$$

Onde:

- Y: variável dependente, concentração inibitória mínima (CIM) em µL.µL<sup>-1</sup>;
- $\beta_0$ ,  $\beta_i$ ,  $\beta_{ii}$  e  $\beta_{ij}$ : constantes linear, quadrática e da interação das variáveis dependentes, respectivamente;
- $X_i$ ,  $X_j$  e  $X_{ij}$ : efeitos das variáveis independentes, respectivamente pelos modelos linear, quadrático e interação dos efeitos.

Os coeficientes das variáveis independentes foram estimados pelo modelo de regressão linear e avaliados pela análise de variância (ANOVA). Para a visualização das superfícies de resposta, obtidas pelo efeito da inter-relação entre as variáveis independentes sobre a variável resposta, gráficos foram construídos a partir do *software* Statistic®.

### 3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

---

De acordo com a tabela 3, podemos verificar que a extração por turbólise foi o método mais eficaz apresentando a menor concentração inibitória mínima (CIM) em *S. mutans*, *S. oralis*, e *S. parasanguinis*, quando comparado aos métodos da maceração e ultrassom (tabela 3). A bactéria mais sensível foi o *S. parasanguinis*, apresentando mediana de  $1,56 \mu\text{L} \cdot \mu\text{L}^{-1}$  para a CIM.

Considerando que o método de extração por turbólise necessita de menos tempo na produção de extratos, com duração de cerca de 15 min, este seria um excelente método para, em escala industrial, otimizar a resposta biológica e o tempo para produzir o fitoterápico. Entretanto, em pesquisa avaliando processos extrativos observou-se que esse método extrai menos fitoconstituintes, o que não afetaria sua atividade antimicrobiana, ao menos para *Streptococcus* sp, mas poderia reduzir o rendimento do processo (LIU et al., 2014).

Como a turbólise foi o método mais eficaz, as demais etapas do planejamento foram desenvolvidas apenas com extratos obtidos por turbólise. Nesse aspecto, através das várias interações das variáveis independentes, concentração do vegetal (V/S) e proporção hidroalcoólica (A/A), organizou-se uma matriz apresentando a influência dessas variáveis em vários níveis, como descrito na metodologia, na concentração inibitória mínima (em  $\mu\text{L} \cdot \mu\text{L}^{-1}$ ) de *S. mutans*, *S. oralis*, *S. salivarius*, e *S. parasanguinis*, conforme disposto na tabela 3.

Tabela 3: Distribuição das concentrações inibitórias mínimas (CIMs) dos extratos hidroalcoólicos de *C. blanchetianus* Baill (casca) frente a *Streptococcus* sp, considerando diferentes métodos de extração.

Bactérias Testadas	Método de Extração	CIM ( $\mu\text{L} \cdot \mu\text{L}^{-1}$ )			p-valor	Bactérias Testadas	Métodos de extração	CIM ( $\mu\text{L} \cdot \mu\text{L}^{-1}$ )			p-valor
		Mediana (25-75)	Média	DP				Mediana (25-75)	Média	DP	
<i>S. mutans</i>	Mac	3,12	5,55	3,68		<i>S. oralis</i>	Mac	3,12	6,65	4,37	
		3,12-6,25						3,12-12,5			
	Turb	3,12	2,68	1,50			Turb	3,12	3,58	2,16	
		1,56-3,12						3,12-3,12			
	Ult	6,25	5,72	4,37			Ult	6,25	5,78	3,39	
		3,12-6,25						3,12-6,25			
	<i>P(M-T)*</i>			<i>P&lt;0,05</i>		<i>P(M-T)*</i>			<i>P&lt;0,05</i>		
	<i>P(M-U)</i>			<i>P=0,122</i>		<i>P(M-U)</i>			<i>P=0,244</i>		
	<i>P(T-U)*</i>			<i>P&lt;0,05</i>		<i>P(T-U)*</i>			<i>P&lt;0,05</i>		
<i>S. salivarius</i>	Mac	3,12	3,93	1,58		<i>S. parasanguinis</i>	Mac	3,12	4,10	2,07	
		3,12-6,25						3,12-6,25			
	Turb	3,12	4,16	3,13			Turb	1,56	1,99	0,84	
		3,12-6,25						1,56-3,12			
	Ult	3,12	4,10	1,84			Ult	3,12	3,84	1,99	
		3,12-6,25						1,56-6,25			
	<i>P(M-T)</i>			<i>P=0,124</i>		<i>P(M-T)*</i>			<i>P&lt;0,05</i>		
	<i>P(M-U)</i>			<i>P=0,118</i>		<i>P(M-U)</i>			<i>P=0,119</i>		
	<i>P(T-U)</i>			<i>P=0,239</i>		<i>P(T-U)*</i>			<i>P&lt;0,05</i>		

(\*): Diferença estatisticamente significativa para um nível de significância de 0.05 no ANOVA *one-way*, Pos Hoc Tukey; Mac: Maceração; Turb: Turbólise; Ult: Ultrassom; *P(M-T)*: Diferença estatística entre maceração e turbólise; *P(M-U)*: Diferença estatística entre maceração e ultrassom; *P(T-U)*: Diferença estatística entre turbólise e ultrassom.

Os dados da tabela 4 mostram a disposição dos experimentos, respectivamente com as médias e desvio-padrão das réplicas feitas para cada combinação das variáveis independentes. As análises foram feitas em dias alternados e aleatoriamente, para diminuir o risco de erros ou da influência de outras variáveis não controladas. Nesta matriz de dados podemos observar que as menores CIMs foram determinadas para *S. salivarius* e *S. parasanguinis*, em ambas, quando utilizou-se a matéria vegetal na concentração de  $0,14 \text{ g.mL}^{-1}$  e o solvente na proporção hidroalcoólica de 90%, foi obtido uma CIM de  $1,04 \pm 0,26 \mu\text{L}.\mu\text{L}^{-1}$ .

Tabela 4: Distribuição das CIMs (média e desvio-padrão) do extrato hidroalcoólico de *C. blanchetianus* Baill obtido por turbólise, de acordo com as associações vegetal:solvente e álcool:água, frente a *Streptococcus* sp.

Experimentos	Variáveis Independentes		Variáveis Dependentes (CIM*)							
	V/S	A/A	<i>S.mutans</i>	$\sigma$	<i>S.oralis</i>	$\sigma$	<i>S.salivarius</i>	$\sigma$	<i>S.parasanguinis</i>	$\sigma$
	1	-1	-1	2,60	0,52	8,33	2,08	8,33	2,08	6,25
2	-1	0	2,60	0,52	2,60	0,52	1,56	-	2,08	0,52
3	-1	1	3,12	1,56	3,12	-	8,36	2,11	6,25	-
4	0	-1	4,68	1,56	3,12	-	5,20	1,04	6,26	0,35
5	0	0	1,82	0,68	2,60	0,52	3,12	-	3,12	-
6	0	1	1,56	-	2,60	0,52	1,04	0,26	1,04	0,26
7	1	-1	3,12	-	4,16	1,04	4,16	1,04	6,25	-
8	1	0	2,60	0,52	2,60	0,52	3,12	1,56	2,60	0,46
9	1	1	2,08	0,52	3,12	-	2,60	0,52	3,12	-

( $\sigma$ ): Desvio-Padrão. (\*):Concentração inibitória mínima (em  $\mu\text{L}.\mu\text{L}^{-1}$ ).

Os resultados da tabela 5 apontam que a variável A/A, utilizada como solvente nas extrações, exerceu um efeito significativo sobre as CIMs de *S. oralis* ( $p=0,02$ ), *S. salivarius* ( $p=0,014$ ) e *S. parasanguinis* ( $p<0,001$ ) e que a concentração do vegetal no processo extrativo só exerceu efeito sobre *S. salivarius* ( $p=0,047$ ) e *S. parasanguinis* ( $p<0,001$ ). Nos casos onde as variáveis independentes não exerceram efeito significativo será necessário que em outros

experimentos aumentem a faixa de valores. Por exemplo, na faixa de valores utilizadas para A/A e V/S essas variáveis não exerceram nenhum efeito adicional à atividade antimicrobiana sobre *S. mutans*, então será necessário que se utilize uma faixa maior de valores para essas variáveis, adotando um planejamento  $3^2$ , por exemplo, para que o efeito sobre a CIM seja significativa. Em todas as bactérias a variável que mais exerceu efeito nas CIMs das bactérias foi a proporção álcool:água utilizada na extração. Neste aspecto, um estudo confirmou que alterações na polaridade dos solventes, como acontece na alteração da proporção hidroalcoólica, alteram a quantidade e a qualidade dos fitoconstituintes, o que desencadeia essa alteração biológica no âmbito antimicrobiano (KUZMA et al., 2014).

Tabela 5: Análise estatística e efeito estimado das variáveis independentes sobre as respostas (CIMs das bactérias testadas).

Respostas	Variáveis			
	Vegetal:solvente (V/S)		Álcool:água (A/A)	
	Efeito	p-valor	Efeito	p-valor
<i>S. mutans</i>	0,06	0,96	2,99	0,27
<i>S. oralis</i>	8,78	0,035	18,01	0,002*
<i>S. salivarius</i>	24,91	0,047*	24,68	0,014*
<i>S. parasanguinis</i>	4,43	0,0000**	32,71	0,0000**

(\*) valores significativos para  $p < 0,05$ ; (\*\*) valores significativos para  $p < 0,001$ .

Nas tabelas 6 e 7, verificamos que o modelo obtido pelo ANOVA não precisou de ajustes, apresentando  $p < 0,05$  para *S. salivarius*, *S. oralis* e *S. parasanguinis*, a exceção de *S. mutans*, pois para esse bactéria a falta de ajuste foi significante ( $p = 0,02$ ). As variáveis independentes não apresentaram efeito sobre a CIM de *S. mutans*, entretanto os valores da proporção vegetal: solvente foram significativos sobre *S. oralis* tanto no modelo linear, quanto no quadrático. Sobre *S. parasanguinis* ambas as variáveis exerceram efeitos significativos nos modelos linear e quadrático, assim como houve interação significativa entre as variáveis,

demonstrando que quando analisadas ao mesmo tempo, ambos os fatores (V/S e A/A) interferiram na atividade antimicrobiana ( $p < 0,001$ ).

Tabela 6: Análise de variância (ANOVA) para as respostas, obtida a partir da otimização das proporções de vegetal(V) e hidroalcoólica (P) (valores de  $p$ ).

Fonte	CIMs ( $\mu\text{L} \cdot \mu\text{L}^{-1}$ )			
	<i>S.mutans</i>	<i>S.oralis</i>	<i>S.salivarius</i>	<i>S.parasanguinis</i>
V	-0,052	-0,027*	-0,0000**	-0,0000**
P	-0,340	- 0,0000**	-0,052	-0,01*
V <sup>2</sup>	-0,402	-0,440	-0,040*	-0,531
P <sup>2</sup>	-0,436	-0,039*	-0,102	-0,038*
VP	-0,08	-0,432	-0,024*	-0,0000**
Regressão	0,068	0,021*	-0,0000**	0,003*
R <sup>2</sup>	0,088	0,0886	0,985	0,859
R <sup>2</sup> (adjust)	0,026*	0,970	0,869	0,990
Falta de Ajuste	0,002*	0,756	0,252	0,367

(\*) valores significativos para  $p < 0,05$ ; (\*\*) valores significativos para  $p < 0,001$

Os coeficientes das variáveis no modelo de regressão foram negativos, mostrando que à medida que aumentamos a proporção hidroalcoólica e a quantidade de vegetal, ocorre uma maior inibição bacteriana, ou seja, uma redução da CIM, até que se atinja o ponto ótimo. Os valores de  $p$  significativos na regressão ( $p < 0,01$ ) e os valores não-significativos da falta de ajuste mostram que o polinômio de segunda ordem proposto pela análise de regressão foram ajustados para representar a relação entre as variáveis e os resultados experimentais, apesar de não ser aplicável aos resultados obtidos para *S. mutans*. Estas relações podem ser melhor compreendidas pela análise das superfícies de resposta para cada variável dependente., como representadas nas figuras de 2 a 5.

Tabela 7: Coeficientes de regressão para os valores das respostas no modelo experimental.

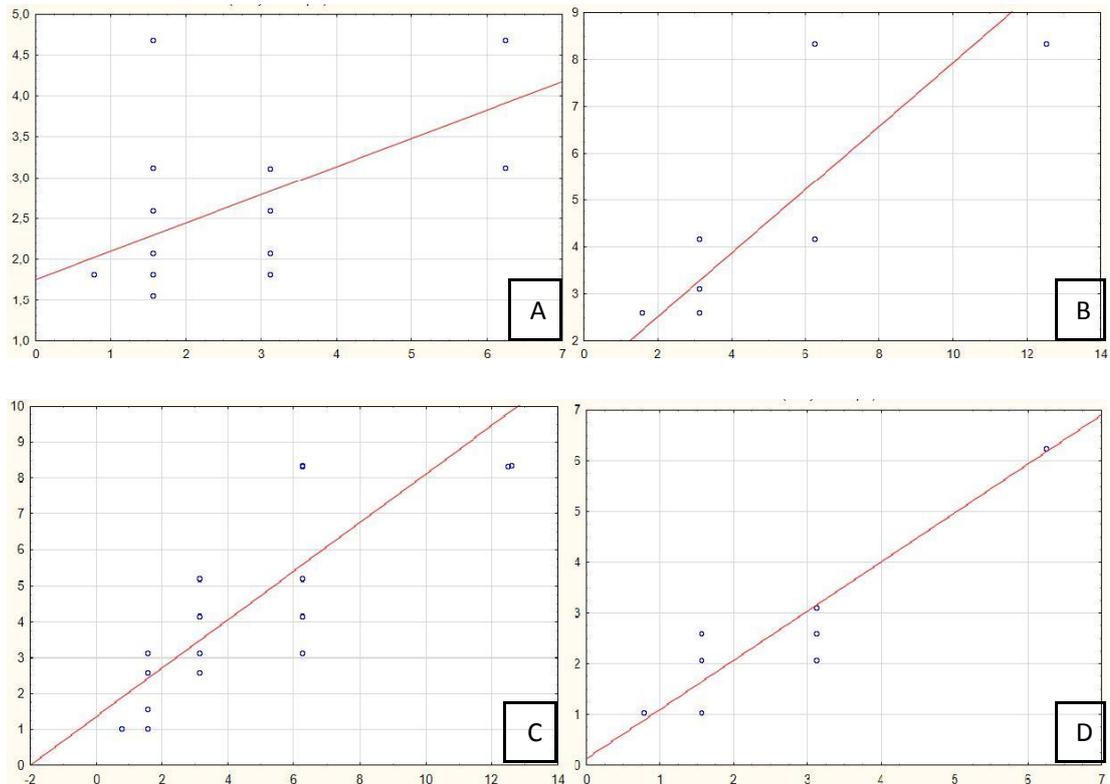
Fonte	CIMs ( $\mu\text{L} \cdot \mu\text{L}^{-1}$ )			
	S.mutans	S.oralis	S.salivarius	S.parasanguinis
Constante	4,65	5,34	4,06	3,31
V	-0,926	-1,534	-1,99	-1,036
P	-1,39	-1,835	-0,987	-0,609
V <sup>2</sup>	-0,252	-0,484	-0,531	-0,442
P <sup>2</sup>	-0,378	-0,532	-0,554	-0,130
VP	0,16	1,22	1,42	0,98

(V): Proporção vegetal:solvente (V/S); (P): Proporção álcool:água (A/A).

A qualidade do ajuste do modelo pode ser observada através dos gráficos de valores observados X valores preditos. Quanto mais os dados se ajustam à reta identidade, melhor a qualidade do modelo. Através da figura 1, esse aspecto pode ser observado e pode-se concluir que os modelos de maior qualidade foram apresentados para *S. salivarius* e *S. parasanguinis*. Entretanto os pontos entre os valores preditos e os observados estão muito distantes no modelo adotado para *S. mutans*, e, portanto este não se apresentou adequado para inferir dados a cerca da atividade antimicrobiana para esse patógeno.

Os coeficientes das variáveis no modelo de regressão foram negativos, mostrando que à medida que aumentamos a proporção hidroalcoólica e a quantidade de vegetal, ocorre uma maior inibição bacteriana, ou seja, uma redução da CIM, até que se atinja o ponto ótimo. Os valores de p significativos na regressão ( $p < 0,01$ ) e os valores não-significativos da falta de ajuste mostram que o polinômio de segunda ordem proposto pela análise de regressão foram ajustados para representar a relação entre as variáveis e os resultados experimentais, apesar de não ser aplicável aos resultados obtidos para *S. mutans*. Estas relações podem ser melhor compreendidas pela análise das superfícies de resposta para cada variável dependente., como representadas nas figuras de 2 a 5.

Figura 1: Gráfico dos valores observados (eixo horizontal) x valores preditos (eixo vertical).  
 A: CIM *S. mutans*; B: CIM *S. oralis*; C: CIM *S. salivarius*; D: CIM *S. parasanguinis*.



Através deste desenho fatorial podemos observar as superfícies de resposta (figuras 2 a 5) que representam as variações das CIMs determinadas pela interação entre as variáveis independentes de proporção álcool/água e proporção vegetal/solvente, resultantes das atividades antimicrobianas sobre todos os *Streptococcus* sp. testados. Diversas espécies de *Croton* sp. apresentaram efetividade antibacteriana *in vitro*, seja bactericida ou bacteriostática, sobre estreptococos orais, em diversas análises e estudos publicados. Extratos brutos hidroalcoólicos e etanólicos, assim como derivados terpenóides isolados de espécies como o *C. sonderianus*, *C. nepetaefolius* e *C. mapestris* apresentaram efetividade em testes de microdiluição sobre *S. mutans*, *S. salivarius* e *S. sanguinis* (SÁ et al., 2012; SILVA et al., 2012), sem avaliação do processo de otimização desta resposta biológica.

Figura 2: Superfície de resposta da CIM para *S. mutans* em função das proporções álcool:água (A:A) e vegetal:solvente (V/S).

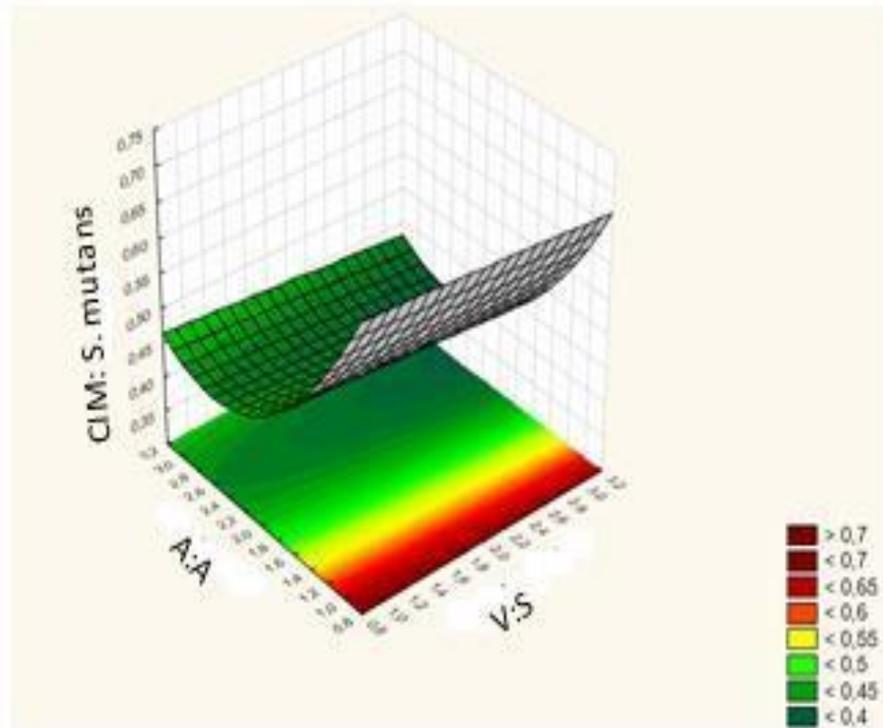


Figura 3: Superfície de resposta da CIM para *S. oralis* em função das proporções álcool:água(A:A) e vegetal:solvente (V/S).

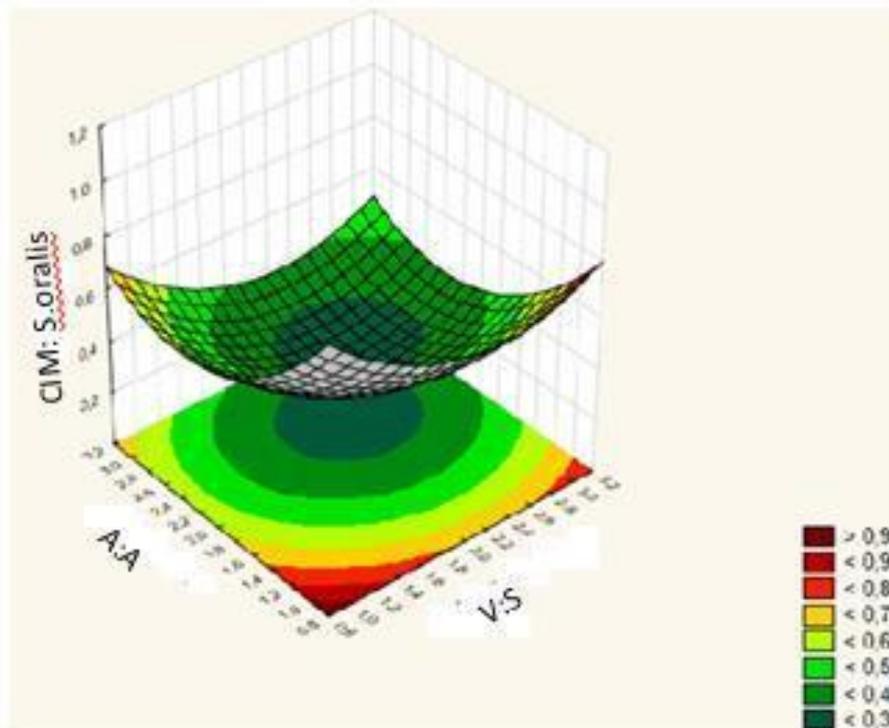


Figura 4: Superfície de resposta da CIM para *S. salivarius* em função das proporções álcool:água(A:A) e vegetal:solvente (V/S).

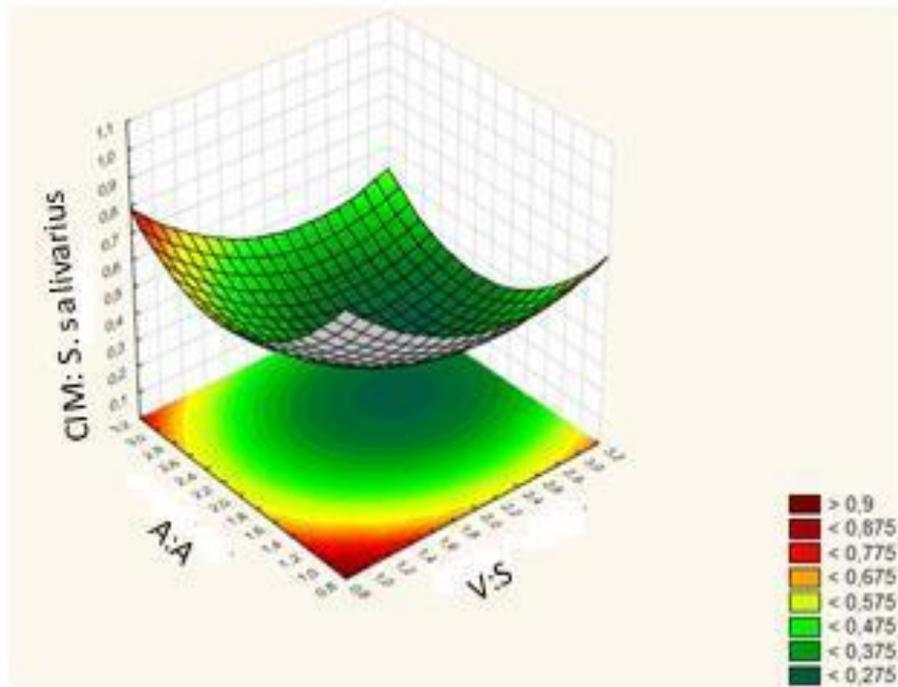
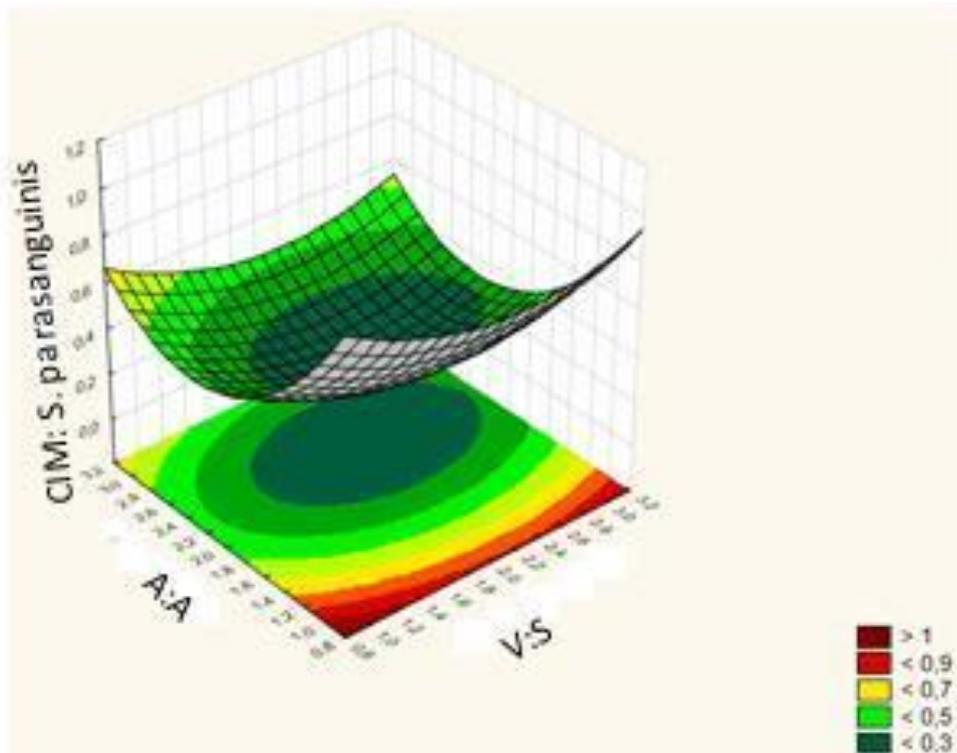


Figura 5: Superfície de resposta da CIM para *S. parasanguinis* em função das proporções álcool:água(A:A) e vegetal:solvente (V/S)



A análise das superfícies de resposta (figuras 2 a 5) mostra que todos os extratos de *C. blanchetianus* foram efetivos na inibição de colônias planctônicas de *S. mutans*, uma bactéria capaz de metabolizar a sacarose convertendo-a em resíduos ácidos, além de produzir proteínas extracelulares envolvidas na coagregação bacteriana no biofilme dental (OKAHASHI et al., 2011). Quando utilizamos soluções extratoras mais concentradas, seja no teor etanólico ou na quantidade de vegetal, ocorre uma maior inibição bacteriana, representada por uma menor CIM do extrato (Figura 2). Mas os valores para esse patógeno devem ser vistos com ressalvas, pois no modelo do planejamento adotado, houve uma falta de ajuste significativa, conforme aponta a falta de ajuste com  $p=0,002$  (Tabela 6).

Streptococos orais como o *S. sanguinis* e o *S. oralis*, são alguns dos microrganismos comensais que podem participar dos mecanismos de formação do biofilme. Sendo considerados colonizadores pioneiros, por serem alguns dos primeiros microrganismos a se aderirem à película adquirida do esmalte, essas bactérias podem produzir moléculas de detecção e de indução de coagregação, possibilitando a adesão de periodontopatógenos como o *P. gingivalis* (PERIASAMY, KOLENBRANDER, 2009; CUADRA-SAENZ et al., 2012).

#### 4. CONCLUSÕES

---

Os extratos hidroalcoólicos de *C. blanchetianus* Baill mostraram-se bastante promissores no controle de bactérias relacionadas com o biofilme dental, sendo o método extrativo por turbólise, o que propiciou maior efetividade sobre *Streptococcus* sp. Na análise das superfícies de resposta para esses estreptococos notam-se regiões nas quais a atividade antimicrobiana é otimizada; nos pontos centrais dos experimentos verifica-se que ocorre uma grande diminuição da CIM para *S. oralis*, *S. salivarius* e *S. paransanguis*. Dessa forma, as concentrações de  $0,14 \text{ g.mL}^{-1}$  de matéria vegetal e a utilização de solventes na proporção álcool:água de 70% corroboram para que os picos ótimos da atividade antimicrobiana sejam alcançados, fatos que são comprovados por coeficientes de regressão negativos e pela significância ( $p<0,05$ ) do modelo produzido a partir da análise de variância por ANOVA.

## REFERÊNCIAS

---

CLSI, *Clinical and Laboratory Standards Institute*. Metodologia dos Testes de Sensibilidade a Agentes Antimicrobianos por Diluição para Bactéria de Crescimento Aeróbico, 2005.

Cuadra-Saenz G, Rao DL, Underwood AJ, Belapure SA, Campagna SR, Sun Z, Tammariello S, Rickard AH. Autoinducer-2 influences interactions amongst pioneer colonizing streptococci in oral biofilms. *Microbiology* 2012; 158 (7): 1783-1795.

Francisco FL, Saviano AM, Pinto Tde J, Lourenço FR. Development, optimization and validation of a rapid colorimetric microplate bioassay for neomycin sulfate in pharmaceutical drug products. *J Microbiol Methods* 2014; 103: 104-11.

González-Centeno MR, Comas-Serra F, Femenia A, Rosselló C, Simal S. Effect of power ultrasound application on aqueous extraction of phenolic compounds and antioxidant capacity from grape pomace (*Vitisvinifera* L.): Experimental kinetics and modeling. *Ultrason Sonochem* 2014; S1350-4177(14): 188-6.

González-Centeno MR, Knoerzer K, Sabarez H, Simal S, Rosselló C, Femenia A Effect of acoustic frequency and power density on the aqueous ultrasonic-assisted extraction of grape pomace (*Vitisvinifera* L.) - A response surface approach. *Ultrason Sonochem* 2014; 21(6): 2176-2184.

Isla MI, Salas A, Danert FC, Zampini IC, Ordoñez RM. Analytical methodology optimization to estimate the content of non-flavonoid phenolic compounds in Argentine propolis extracts. *Pharm Biol.* 2014; 52 (7): 835-840.

Kuźma P, Drużyńska B, Obiedziński M. Optimization of extraction conditions of some polyphenolic compounds from parsley leaves (*Petroselinumcrispum*). *Acta Sci Pol Technol Aliment* 2014;13(2): 145-154

Liu W, Zhou CL, Zhao J, Chen D, Li QH. Optimized microwave-assisted extraction of 6-gingerol from *Zingiber officinale* Roscoe and evaluation of antioxidant activity in vitro. *Acta Sci Pol Technol Aliment* 2014;13(2):155-168.

Okahashi N, Okinaga T, Sakurai A, Terao Y, Nakata M, et al. *Streptococcus sanguinis* induces foam cell formation and cell death of macrophages in association with production of reactive oxygen species. *FEMS Microbiol Lett* 2011; 323: 164–170.

Peretto G, Du WX, Avena-Bustillos RJ, Berrios Jde J, Sambo P, McHugh TH. Optimization of antimicrobial and physical properties of alginate coatings containing carvacrol and methyl cinnamate for strawberry application. *J Agric Food Chem* 2014; 62(4):984-990.

Periasamy S, Kolenbrander PE. Mutualistic biofilm communities develop with *Porphyromonas gingivalis* and initial, early, and late colonizers of enamel. *J Bacteriol* 2009; 191: 6804-6811.

Sá NC, Cavalcante TTA, Araujo AX, Santos HS, Albuquerque MRR. Antimicrobial and antibiofilm action of Casbane Diterpene from *Croton nepetaefolius* against oral bacteria. *Arch Oral Biol* 2012; 57: 550-555.

Sastriyanarayanan G, Gandhimathi R, Sabarathnan B, Kiran GS, Selvin J. Optimization and production of pyrrolidone antimicrobial agent from marine sponge-associated *Streptomyces* sp. MAPS15. *Bioprocess Biosyst Eng* 2014; 37: 561-573.

Siani AC, Nakamura MJ, Dos Santos DS, Mazzei JL, do Nascimento AC, Valente LM. Efficiency and selectivity of triterpene acid extraction from decoctions and tinctures prepared from apple peels. *Pharmacogn Mag* 2014; 10(S2): 225-231.

Silva AC, Lopes PM, de Azevedo MM, Costa DC, Alviano CS, Alviano DS. Biological activities of  $\alpha$ -pinene and  $\beta$ -pinene enantiomers. *Molecules* 2012; 17(6):6305-6316.

## CAPÍTULO II

---

SOUZA, Emmanuel Albuquerque de. **Caracterização química e ensaios de toxicidade aguda, citotoxicidade *in vitro* e atividade antibacteriana sobre periodontopatógenos do *Croton blanchetianus* Baill.** Campina Grande-PB: UEPB, 2014. 160p. (Dissertação – Mestrado em Odontologia).

### RESUMO

Estudos etnobotânicos e laboratoriais têm apontado grandes perspectivas na utilização de espécies do gênero *Croton*, família Euphorbiaceae, no controle dos biofilmes orais. Este trabalho avaliou as características químicas e as potencialidades biológicas na periodontia do extrato nebulizado (ENM) de *Croton blanchetianus* Baill. Para análise química foram utilizadas a Cromatografia Gasosa acoplada a Espectrometria de Massas (CG-EM) e Termoanálises. Na atividade antibacteriana foram determinadas as concentrações inibitórias mínimas (CIMs) sobre *Porphyromonas gingivalis*, *Prevotella intermedia*, *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* e *Fusobacterium nucleatum*; para esta última bactéria também foi avaliada a atividade antibiofilme. Foram realizados ensaios de viabilidade celular com macrófagos RAW 264.7 e de toxicidade aguda em ratos Wistar. No CG-EM identificou-se 0,17% de xilitol e 0,28% de epicatequina no ENM; o extrato testado apresentou CIM de 15,6  $\mu\text{g.mL}^{-1}$  sobre todas as bactérias, inibiu a aderência de *F. nucleatum* entre 1000  $\mu\text{g.mL}^{-1}$  e 500  $\mu\text{g.mL}^{-1}$ , reduziu a viabilidade celular entre 1000  $\mu\text{g.mL}^{-1}$  e 31,2  $\mu\text{g.mL}^{-1}$  e não alterou parâmetros hematológicos e bioquímicos em ratos Wistar. Conclui-se que o *C. blanchetianus* não apresenta toxicidade aguda e possui grandes perspectivas para ser utilizado no tratamento das doenças periodontais.

## 1. INTRODUÇÃO

---

As plantas medicinais são uma fonte importante de produtos naturais biologicamente ativos, muitos dos quais, pode-se utilizar para a síntese de inúmeros fármacos. Segundo a Organização mundial de Saúde (OMS), dos 252 fármacos considerados básicos e essenciais, 11% são exclusivamente de origem vegetal. A região Nordeste do Brasil abriga em seu ecossistema, com predominância de Caatinga, uma grande biodiversidade, com um habitat específico para plantas medicinais e aromáticas para este bioma. Diante do potencial botânico dessa região, destaca-se a família Euphorbiaceae, representante de inúmeras espécies do gênero *Croton*, relacionadas em estudos etnobotânicos, a uma grande variedade de efeitos biológicos (ALBUQUERQUE et al., 2007; CARTAXO et al., 2010).

Pesquisas têm apontado grandes perspectivas na utilização de fitoterápicos no controle do biofilme dental, definido como uma comunidade microbiana séssil, aderida à superfície dental e extremamente organizada. Essa estrutura está intimamente relacionada com as doenças periodontais, processos patológicos que acometem a estrutura tecidual perirradicular dos dentes, lesionando os tecidos de sustentação e de proteção gengivais. Conforme o biofilme se desenvolve, com mecanismos de coagregação bacteriana, diversas mudanças locais ocorrem e suas camadas mais internas, apresentam menor disponibilidade de alguns nutrientes e de oxigênio, favorecendo o crescimento de microrganismos anaeróbios restritos (DARVEAUE et al., 1997; BEDRAN et al., 2010).

Os periodontopatógenos, bactérias envolvidas nas doenças periodontais, correspondem a espécies Gram negativas, como *Fusobacterium nucleatum*, *Porphyromonas gingivalis* e *Prevotella intermedia*; além de Gram positivas, como o *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*. No atual paradigma das doenças periodontais, esses patógenos são essenciais para o início da doença; contudo, a extensão e severidade dependem das interações microbiota-hospedeiro (BEUTLER et al., 2003; FINE et al., 2014).

Como resposta ao reconhecimento de lipopolissacarídeos e leucotoxinas presentes nesses patógenos, células do sistema imune, como os macrófagos, passam a produzir mediadores biológicos pró-inflamatórios, fatores de necrose tumoral e prostaglandinas, as quais podem atingir concentrações patologicamente elevadas nos tecidos periodontais. Então, a partir da ativação de células de defesa, como os macrófagos, enzimas como as metaloproteases degradam as fibras colágenas, alteram a anatomia normal dos tecidos gengivais e resultam na destruição do ligamento periodontal (FINE et al., 2009).

A utilização de agentes químicos no controle do biofilme dental tem sido avaliada na periodontia há décadas e podem romper as estruturas intermicrobianas, desorganizando-as. Os ensaios que foram usados para testar as propriedades antimicrobianas de extratos de plantas medicinais envolvem a avaliação da capacidade do material vegetal de inibir o crescimento de organismos patogênicos típicos, tais como o *P. gingivalis*. Esses estudos estabeleceram claramente que muitas plantas medicinais têm potencial para serem utilizadas na indústria de produtos odontológicos, dada a sua atividade contra bactérias associadas às doenças periodontais (HOLT, EBERSOLE, 2005; BYRNE et al., 2009; BONIFAIT et al., 2012).

No desenvolvimento de fitoterápicos os extratos secos são utilizados como principal matéria-prima ativa. Os processos de secagem, como a nebulização ou *spray drying*, propiciam maior estabilidade térmica, físico-química e microbiológica, além de maior concentração de compostos bioativos, facilitando a padronização, a obtenção de produtos com alta uniformidade granulométrica, e a maior eficácia terapêutica (ZETOLA et al., 2002; SOARES et al., 2005; GEORGETTI et al., 2008).

Neste âmbito, este trabalho consistiu, essencialmente, em caracterizar amostras de extrato nebulizado de *Croton blanchetianus* Baill sob o ponto de vista biológico, apontando suas potencialidades sobre patógenos relacionados com a doença periodontal e seus aspectos toxicológicos; e químico, caracterizando-os através de análises termoanalíticas e cromatográficas.

## 2. MATERIAIS E MÉTODOS

---

### 2.1. Coleta e identificação do material vegetal

Amostras da casca da planta foram coletadas no estado da Paraíba, região nordeste do Brasil, na microrregião dos Cariris, no município de Aroeiras, com as seguintes coordenadas: Latitude: 7,543798/7°32'37,67''S e Longitude: -5,746061/35°44'45,82''W. Foram selecionadas espécies adultas com auxílio de um botânico especializado em plantas da caatinga, na estação conhecida como alto verão, que se estende de setembro a fevereiro, respeitando-se o horário ideal de coleta. Foram realizadas exsiccatas, para identificação e verificação da autenticidade botânica do *Croton blanchetianus* Baill. seguido de depósito, com tombamento

n° 4946, no herbário do Centro de Ciências Tecnológicas e Rurais (CCTR) da Universidade Federal de Campina Grande (UFCG). Após a coleta da planta, as amostras da casca foram colocadas em estufa de circulação de ar, Fanem<sup>®</sup> 330. E após a estabilização do peso foram pulverizadas em moinho de facas, SOLAB<sup>®</sup>, obtendo-se partículas de 10 mesh.

## 2.2. Obtenção do extrato vegetal

Foi obtido um extrato hidroalcoólico, pelo método de turbólise, no qual as amostras foram agitadas, durante 15 minutos, a 6000 rpm, em um aparelho IKA T25 Ulturrax<sup>®</sup>. Nesse processo utilizou-se 0,14 g.L<sup>-1</sup>, de proporção vegetal:solvente, e solução hidroalcoólica a 70%. Esse extrato foi, então, submetido à secagem, em um aparelho *Spray Dryer* LabPlant<sup>®</sup>, utilizando como estabilizante farmacotécnico Aerosil 200<sup>®</sup>, na concentração de 20%, o qual foi calculado em relação à massa teórica do resíduo seco. Foi utilizada uma temperatura de entrada de 100 °C, a vazão de ar de atomização de 4 mL.min<sup>-1</sup> e do ar de secagem de 27,83 m<sup>3</sup>.h<sup>-1</sup>.

## 2.3. Cromatografia Gasosa acoplada a Espectrômetro de Massas (CG-EM)

Para avaliação química quantitativa e qualitativa utilizou-se o aparelho CG-MS – QP 2010<sup>®</sup>, com o detector da fonte de íons a 200°C e a interface a 280°C, em modo scan: 40 – 80 m/z. Utilizou-se uma coluna RTX SMS<sup>®</sup>, de 30m de comprimento, 0,25 mm de diâmetro interno e 0,25 µm de tamanho de partícula, com forno a 80°C; o gás de injeção foi o He (hélio) a um fluxo de 1mL.min<sup>-1</sup>.

A amostra foi submetida a uma pressão de 65 kPa, com velocidade linear de 36,8 cm/s; no modo de injeção Split, na razão de 1:50 com volume de injeção de 0,3 µL, em um tempo de corrida de 63 min. O forno foi programado com razão de 4 °C.min<sup>-1</sup>, com temperatura variando de 40 e 60 °C; de 60 a 250 °C, à razão de 8 °C.min<sup>-1</sup>; e por fim, de 250 a 320°C, na razão de 10°C.min<sup>-1</sup>.

O processo de derivatização/silanização foi realizado na análise das amostras de ENM antes da injeção no aparelho. Preparou-se 20mg da amostra adicionando-se 500µL de N-Methyl-N-(trimethylsilyl)trifluoroacetamide. A amostra foi deixada 15 min na estufa a 60°C, em seguida secou-se com N<sub>2</sub> gasoso e adicionou-se 600 µL de hexano. Para identificação dos seus constituintes utilizou-se a biblioteca Wiley Registry<sup>TM</sup> of Mass Spectral Data, 2008.

## 2.4. Análise Térmica

As curvas de DSC foram obtidas em calorímetro TA Instruments, modelo DSC Q20<sup>®</sup>, utilizando cadinhos de alumínio com cerca de  $2,0 \pm 0,1$  mg de amostra, em atmosfera de nitrogênio (fluxo de  $50 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$ ). Os experimentos foram realizados na faixa de temperatura entre 25 a 400 °C, utilizando-se razão de aquecimento de  $5 \text{ }^\circ\text{C} \cdot \text{min}^{-1}$ . O índio (PF 156,6 °C) foi utilizado como padrão para a calibração do equipamento. Os dados foram analisados usando o software TA Instruments Universal Analysis 2000<sup>®</sup>, 4.7A.

As curvas termogravimétricas não-isotérmicas foram obtidas em um analisador simultâneo TG/DTA/DSC, modelo Q600 (TA Instruments), utilizando cadinhos de alumina, com cerca de  $8,0 \pm 0,1$  mg de amostra, em atmosfera de nitrogênio (fluxo de  $50 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$ ). Os experimentos foram realizados no intervalo temperatura entre 25 e 900 °C, utilizando-se razão de aquecimento de  $5 \text{ }^\circ\text{C} \cdot \text{min}^{-1}$ . O aparelho foi calibrado com oxalato de cálcio monohidratado e os dados foram analisados usando o software TA Instruments Universal Analysis 2000, 4.7A.

## 2.5. Atividade antimicrobiana sobre periodontopatógenos

Na avaliação da atividade antimicrobiana foram incluídas bactérias envolvidas na formação do biofilme subgingival, relacionadas com as doenças periodontais. Foram utilizadas cepas padrão *American Type Culture Collection* (ATCC) de: *Prevotella intermedia* (25611), *Porphyromonas gingivalis* (33277), *Fusobacterium nucleatum* (25586) e *Aggregatibacter actinomycetencomitans* (33384). Todas as bactérias foram cultivadas em TSB (*Trypticase Soy Broth*) contendo  $1 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$  de extrato de levedura,  $5 \text{ } \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$  de hemina e  $1 \text{ } \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$  de menadiona, sob condições anaeróbicas, com uma atmosfera de 90% de N<sub>2</sub>, 5% de CO<sub>2</sub>, e 5% de H<sub>2</sub>, por 48 horas, a  $37 \pm 0,5^\circ\text{C}$ . Depois desse período, observou-se o crescimento bacteriano pelo grau de absorvância, em espectrofotômetro Biospectro<sup>®</sup>, ajustando-o ao comprimento de onda em 625 nm. O inóculo bacteriano foi diluído com TSB até que atingisse um grau de absorvância entre 0,1 e 0,5, obtendo-se um inóculo com  $5,0 \times 10^8 \text{ UFC} \cdot \text{mL}^{-1}$ .

Utilizou-se o método de microdiluição para bactérias anaeróbias descrito pela *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI, 2008), em microplacas de 96 poços (TPP<sup>®</sup>). Foram plaqueados 100  $\mu\text{l}$  de meio TSB; 100  $\mu\text{l}$  das soluções-testes (soluções de 4000  $\mu\text{g}$  das amostras do extrato nebulizado (ENM)/ 1 ml de solvente (100  $\mu\text{l}$  de álcool 96°: 900  $\mu\text{l}$  de água destilada), sendo realizadas oito diluições seriadas nos poços das respectivas colunas da microplaca; e 100

$\mu\text{L}$  do inóculo bacteriano. Os solventes foram utilizados como controle negativo e digluconato de clorexidina (Sigma Aldrich<sup>®</sup>) a 0,12%, como controle positivo. Os testes foram realizados em triplicata, e as microplacas foram incubadas em anaerobiose, por 48 horas, a  $37\pm 0,5^\circ\text{C}$ . Após esse período, para determinação da concentração inibitória mínima (CIM) foi adicionado 20  $\mu\text{L}$  de resazurina (Sigma Aldrich<sup>®</sup>) a 0,01%, verificando-se a redução colorimétrica do corante para azul nos poços, onde não houve presença de bactérias viáveis.

## 2.6. Atividade antibiofilme sobre *Fusobacterium nucleatum*

Nessa análise foi necessária a utilização de saliva, a qual seguiu o protocolo de Guggeheim et al. (2001). Para isso, estimulou-se a salivação do pesquisador durante duas horas, o qual estava em jejum há dez horas. Antes da coleta higienizou a cavidade oral com água destilada e escova dental. A saliva foi coletada em tubo Falcon, nas seguintes proporções: 1 mL de saliva/1 mL de tampão PBS/2  $\mu\text{L}$  de PMSF (*Phenylmethylsulfonyl*), a fim de prevenir a ocorrência de proteólise. Em seguida, centrifugou-se durante 10 min., a 6350 rpm, com temperatura de  $4^\circ\text{C}$ . O sobrenadante foi desprezado e, posteriormente, filtrou-se o conteúdo resultante a vácuo pelo sistema Filtermax<sup>®</sup>, com membrana PES<sup>®</sup> de 0,22  $\mu\text{m}$ , a fim de manter o líquido estéril.

No ensaio do biofilme utilizaram-se cepas de *F. nucleatum* (ATCC 25585), nas mesmas condições de cultivo e concentração do inóculo, descritas no item 2.5, seguindo o protocolo de Stepanovic et al (2000) e Islam et al (2009), com algumas modificações.

Primeiramente 100  $\mu\text{L}$  de saliva foram pipetados em placas de 96 poços, mantendo-as à temperatura ambiente por 2 horas. Depois desse período, o conteúdo salivar foi removido e os poços lavados uma vez com 100  $\mu\text{L}$  de tampão PBS. Em seguida adicionou-se 100  $\mu\text{L}$  de meio TSB (contendo  $1\text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$  de extrato de levedura,  $5\text{ }\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  de hemina,  $1\text{ }\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  de menadiona e 5% de glicose); 100  $\mu\text{L}$  das soluções do ENM, a serem testadas em várias concentrações; e 100  $\mu\text{L}$  do inóculo bacteriano  $5,0 \times 10^8\text{ UFC}\cdot\text{mL}^{-1}$ . Os testes foram feitos em triplicata e as placas mantidas a  $37\pm 0,5^\circ\text{C}$  em condições de anaerobiose. Após esse período o conteúdo dos poços foi removido e estes foram lavados duas vezes com solução salina estéril, para remover as bactérias fracamente aderidas, e mantidas à temperatura ambiente para secagem. Depois de secas adicionou-se 200  $\mu\text{L}$  de cristal violeta a 1%, mantendo-o por 40 min. Em seguida os poços foram lavados duas vezes com solução salina estéril, e mantidas à temperatura ambiente por 20 min para secagem. Após isso, o conteúdo dos poços foi ressuscitado com 200  $\mu\text{L}$  de álcool etílico  $95^\circ$ , durante 40 min. Logo após 150  $\mu\text{L}$  do conteúdo

dos poços foi transferido para outra microplaca, na qual a densidade ótica foi mensurada através de um espectrômetro (Biotrak II Plate Reader), com comprimento de onda de 625 nm. Os dados das absorvâncias dos poços com soluções-teste foram comparados aos poços com meio de cultura e sem inoculo e aos poços com meio de cultura+inoculo. Clorexidina a 0,12% (Sigma Aldrich<sup>®</sup>) foi utilizada como controle positivo.

## 2.7. Teste de citotoxicidade em macrófagos

Os procedimentos experimentais dos testes de viabilidade celular seguiram a metodologia proposta por HOSRY et al (2014). Foram utilizados macrófagos imortalizados (RAW 269.7), em Meio Eagle de Dulbecco modificado - DMEM (GIBCO<sup>®</sup>) acrescido de 10% de soro fetal bovino (GIBCO<sup>®</sup>) e estreptomicina ( $100 \mu\text{g.mL}^{-1}$ ), uma vez que essas células estão relacionadas com a resposta imune do organismo no desenvolvimento das doenças periodontais.

As células foram expostas a diversas concentrações do ENM em DMEM acrescido de 1% de soro fetal bovino (GIBCO<sup>®</sup>), os testes foram feitos em sextuplicata e a microplacas foram incubadas por 48 horas. Depois desse período o conteúdo dos poços foi desprezado, sendo os mesmos submetidos ao teste colorimétrico do MTT. A viabilidade mitocondrial, e conseqüentemente, a viabilidade celular, foi quantificada pela redução do MTT (um sal de coloração amarela e solúvel em água) a formazan (sal de coloração arroxeadada e insolúvel em água) pela atividade daquelas enzimas. Dessa forma, a redução do MTT a formazan, foi considerada diretamente proporcional à atividade mitocondrial e a viabilidade celular.

## 2.8. Ensaio de toxicidade aguda

Este ensaio foi baseado na Resolução N° 90/2004 da ANVISA, utilizando o protocolo experimental de Almeida et al. (1999). Este estudo foi encaminhado e aprovado pelo Comitê de Ética em Animais, n° protocolo 196/2014, do CCTR da Universidade Federal de Campina Grande (UFCG), devidamente regulamentado para este fim, conforme lei 11794/2008 que regulamenta os procedimentos para o uso científico de animais.

Foram utilizados ratos Wistar albinos adultos, sendo dez machos e dez fêmeas. Os animais foram submetidos a um jejum de 12 horas, pesados e em seguida divididos em quatro grupos: dois grupos-controle e dois grupos-teste, sendo utilizados cinco animais para cada

grupo. Os grupos-controle receberam, via oral (gavagem), o veículo solução salina 0,9% (10 ml.kg<sup>-1</sup>); e os grupos-teste receberam uma dose da amostra de ENM na concentração referente a 2 g.kg<sup>-1</sup>, conforme resolução da ANVISA.

Durante o intervalo de 14 dias foi mensurado o parâmetro de consumo de ração e ingestão de água pelos animais. No último dia, correspondente ao 14º dia, os animais foram novamente pesados e, em seguida, anestesiados com cloridrato de quetamina 5% e cloridrato de xilazina 2%. Amostras de sangue foram coletadas através de punção cardíaca, a fim de se avaliar os parâmetros bioquímicas, sendo o sangue acondicionado em tubos contendo gel separador, que foram centrifugados por 15 minutos a 6000 rpm, para obtenção do soro, destinado às dosagens dos seguintes parâmetros: glicose, triglicerídeos, colesterol, HDL-colesterol, aspartato aminotransferase (AST), alanina aminotransferase (ALT), creatinina, ácido úrico e uréia. Nas análises hematológicas, o sangue coletado foi transferido para tubos, contendo anticoagulante (EDTA) para avaliação dos seguintes parâmetros: hemácias, hemoglobina, hematócrito, contagem global e diferencial de leucócitos e plaquetas. Foram realizados esfregaços sanguíneos que após coloração específica foram analisados em microscópio óptico para contagem diferencial dos leucócitos.

Após a retirada do sangue, ocorreu a eutanásia dos animais por deslocamento cervical, seguindo os princípios internacionais para o estudo com animais de laboratório (ZIMMENNANN, 1983). Após isso, foi iniciada a necrópsia dos animais e os órgãos (fígado, baço, coração e rins) examinados macroscopicamente. Para a avaliação do peso dos órgãos, os valores foram obtidos pelo peso relativo em gramas dos órgãos por 100 gramas de massa dos animais. Àqueles órgãos cujos pesos apresentaram diferenças estatisticamente significantes entre os grupos teste e controle, foram submetidos a exame histopatológico com coloração em hematoxilina e eosina (HE), seguindo o protocolo experimental do Laboratório de Patologia Bucal, Universidade Estadual da Paraíba.

## 2.9. Análise Estatística

Utilizou-se o programa estatístico IBM SPSS version 16.0, Chicago, USA para análise estatística dos dados referentes ao ensaio de toxicidade aguda comparando os grupos teste e controle. Como os dados não possuíam distribuição normal utilizou-se o teste Mann-Whitney, com nível de significância de 0,05.

### 3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

---

Neste estudo, o extrato nebulizado das cascas de *C. blanchetianus* Baill (ENM) foi analisado por CG-EM, obtendo-se os cromatogramas relacionados na figura 1 e através dos padrões de fragmentação dos íons os compostos foram identificados comparando-os a Wiley Registry™ of Mass Spectral Data (2008), como está listado na tabela 1. Observa-se nesta análise, uma grande quantidade de açúcares representados por mono e oligossacarídeos, além de diterpenos e catequinas. Vários picos apresentados no cromatograma da figura 1 não foram identificados, o que está relacionado com eventuais sobreposições no processo de separação cromatográfica, como ocorreu nos picos dos compostos com tempos de retenção (em minutos) de 24,23; 26,10; 34,93 e 41,12.

Dentre os compostos dispostos na tabela 1, a sacarose e o kaur-16-eno apresentaram a maior concentração em relação à área total integrada para o cromatograma, respectivamente com 10,68% e 2,5%. Além da sacarose outros açúcares foram identificados como a glicopirranose, glicofuranosídeo e frutose, sendo os principais constituintes da amostra de ENM. Dessa forma, conclui-se que solventes orgânicos, além de processos de purificação, como aqueles relacionados a diferenças de polaridade, podem ser necessários para identificar e/ou concentrar compostos que se apresentaram em baixas proporções ou sequer foram identificados devido à alta concentração de carboidratos.

Para a secagem de extratos derivados de plantas, a seleção e o uso adequado de adjuvantes no processo de *spray drying* é uma fase de fundamental importância, visto que determina a estabilidade e a qualidade dos mesmos, podendo inclusive afetar as características de biodisponibilidade. No processo de nebulização adotado neste estudo, adicionaram-se dióxido de silício coloidal (Aerosil 200®), que apresenta elevada superfície específica e alto poder sorvente, apresentando excelentes resultados na obtenção de produtos secos por aspersão, a partir de soluções extrativas de diferentes espécies vegetais (GEORGETTI et al., 2008).

Figura 1: Cromatogramas obtidos a partir de CG-EM das amostras do extrato nebulizado de *Croton blanchetianus* Baill. Eixo horizontal: Tempo de retenção (Tr) (em minutos); Eixo vertical: Abundância relativa dos constituintes na amostra. A: Tr0-63; B: Tr10-20; C: Tr20-30; Tr32-43.

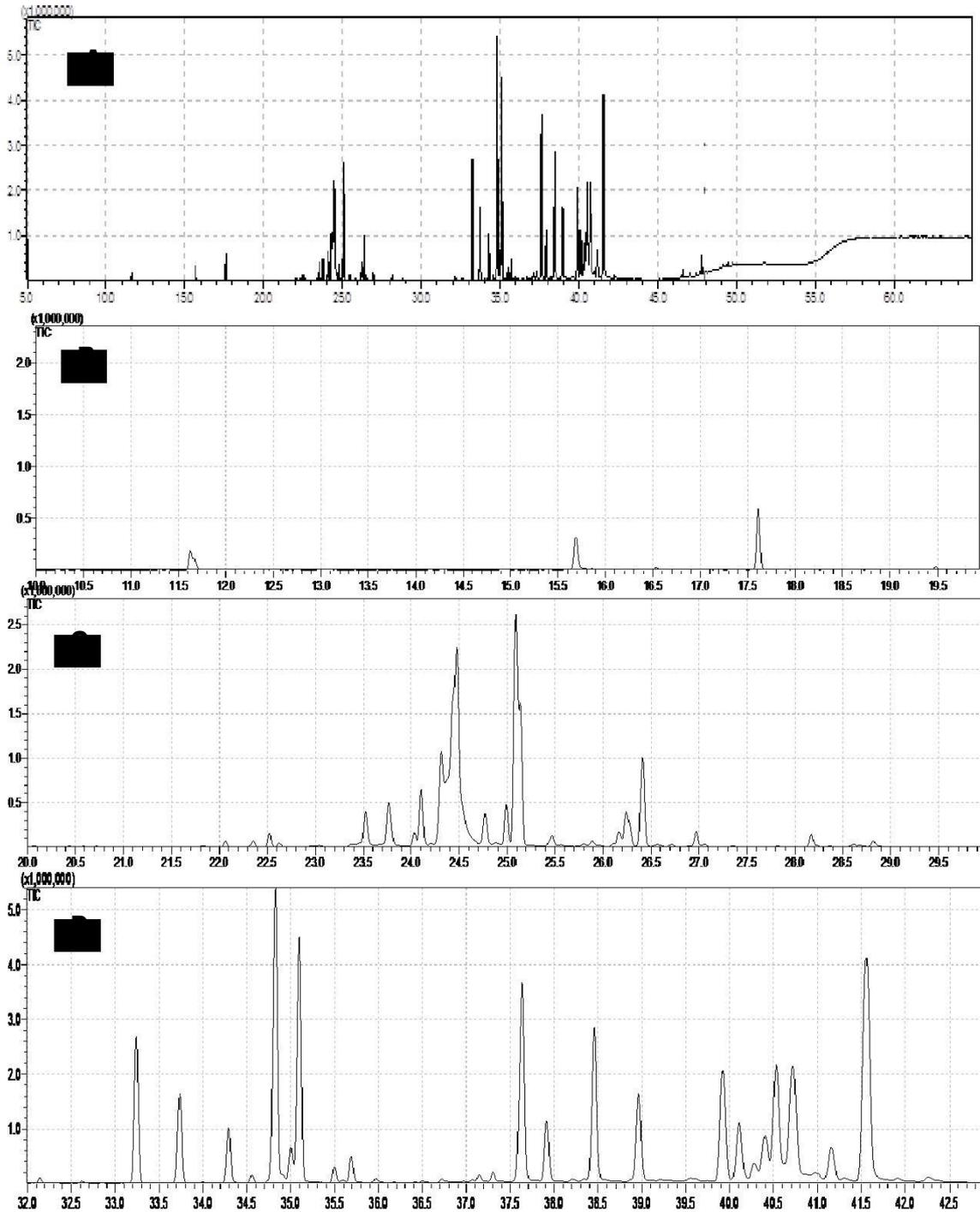
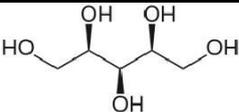
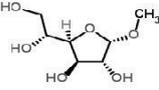
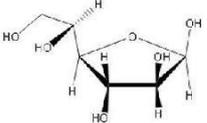
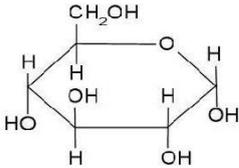
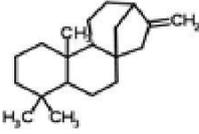
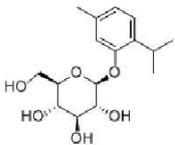
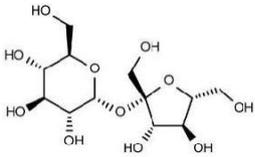
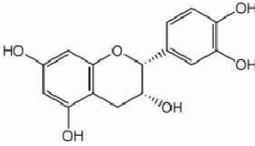


Tabela 1: Constituintes do extrato nebulizado de *Croton blanchetiaus* Baill, identificados por Cromatografia Gasosa acoplada à Espectrômetro de Massas (CG-EM).

Nome do Composto	Fórmula Estrutural	<sup>a</sup> TR <sub>min</sub>	<sup>b</sup> %	<sup>c</sup> Wiley Registry
Xilitol		22,52	0,17	92
Methyl- $\alpha$ -D-Glicofuranose		24,10	0,98	90
D-frutose		24,32	1,81	90
$\alpha$ -D-Glicopirranose		24,99	0,52	95
Ácido hexadecanóico		28,81	0,08	92
Kaur-16-eno		33,73	2,50	90
Timol- $\beta$ -D-glicoside		41,15	1,43	90
Sacarose		41,55	10,68	95
Epicatequina		46,59	0,28	90

(<sup>a</sup>): tempo de retenção (em minutos); (<sup>b</sup>): porcentagem da área total integrada para o cromatograma;

(<sup>c</sup>): porcentagem de similaridade na biblioteca Wiley Registry, 2008.

Na caracterização térmica do ENM evidenciamos na tabela 2 a ocorrência de 3 etapas de decomposição, referentes às análises termogravimétricas. E na tabela 3, três eventos endotérmicos e outro exotérmico, referentes às curvas DSC. Estes processos podem ser bem compreendidos através da análise dos pontos de fusão (PF) e pontos de ebulição (PE) dos componentes do extrato (Merck Index, 2013). O pico endotérmico bem definido entre 187,7 e 220,0 °C pode estar relacionado ao PF da sacarose que equivale a 187,8°C e corresponde a 10,68% da amostra, segundo a análise em CG-EM. Outro pico importante que pode ser visualizado na figura 2, remete ao  $\alpha$ -D-Glicopiranoose, que possui PF de 167,0 °C, o qual está no intervalo do pico endotérmico 162,84°C- 175,62°C.

Tabela 2: Dados de Termogravimetria (TG) referentes às etapas de decomposição do ENM.

<b>Amostra</b>	<b>Etapas</b>	<b>T<sub>I</sub></b>	<b>T<sub>F</sub></b>	<b><sup>a</sup>Perda</b>	<b><sup>a</sup>Resíduo</b>
	1	30,02	99,67	3,23	
<b>ENM</b>	2	99,67	217,83	12,99	
	3	217,23	324,65	26,81	
		324,65	594,06	22,61	28,81

T<sub>I</sub>: Temperatura Inicial (em °C); T<sub>F</sub>: temperatura Final (em °C); (<sup>a</sup>): Dados expressos em percentual.

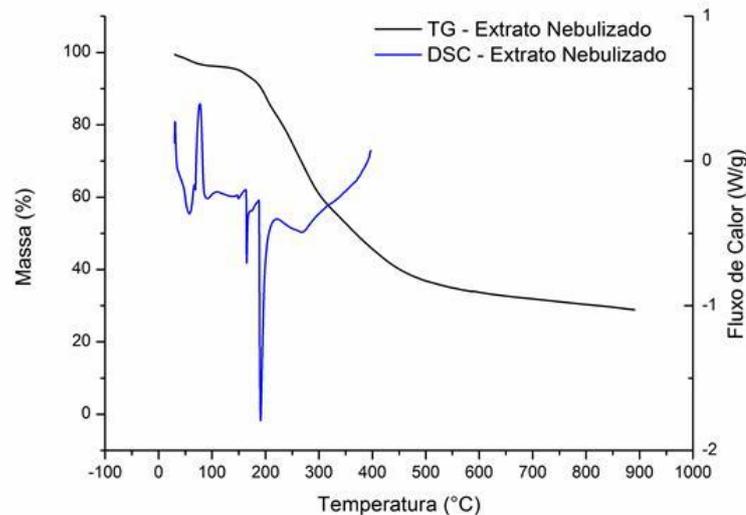
A primeira etapa de decomposição referente ao intervalo 30,02 - 99,67°C pode estar relacionada à perda de umidade da amostra, evidenciando que mesmo após o processo de secagem ainda existem resíduos do solvente hidroalcoólico, o qual corresponde a 3,23% da amostra. Em contrapartida, a última etapa pode estar vinculada a perda de açúcares que iniciam seus processos de degradação na faixa de 324 - 594°C, como o Metil- $\alpha$ -D-Glicofuranose, que apresenta PE em 444,8°C.

Tabela 3: Dados DSC referentes aos processos de transições endotérmicas e exotérmicas, observados no ENM.

Amostra	Etapas	T <sub>I</sub>	T <sub>P</sub>	T <sub>F</sub>	ΔE
ENM	1	32,12	53,99	66,58	38,28
	2	66,58	77,95	90,02	-56,56
	3	162,84	164,75	175,62	6,15
	4	187,70	190,85	220,02	71,39

T<sub>I</sub>: Temperatura Inicial (°C); T<sub>P</sub>: Temperatura de Pico (°C); T<sub>F</sub>: Temperatura Final (°C); ΔE: Variação de energia na etapa, em J/g.

Figura 2: Curvas TG e DSC do extrato nebulizado de *C. blanchetianus* Baill (ENM).



Como o processo de degradação de seus constituintes bioativos inicia-se apenas a 99,67°C (etapa 2), deve-se respeitar esse intervalo térmico, seja durante o processo de preparação de formulações farmacêuticas, ou durante o armazenamento das amostras de ENM. Quando submetidos a temperaturas que ultrapassem esse limite térmico pode haver degradação de fitoconstituintes que podem alterar a resposta fisiológica e terapêutica ao extrato e modificar suas propriedades biológicas.

Os constituintes químicos identificados através das análises químicas podem explicar os resultados encontrados no estudo da ação antibacteriana desse extrato. Os resultados dessa atividade, conforme mostram as tabelas 4 e 5, e a figura 3 apontam que os extratos nebulizados possuíam atividade antimicrobiana sobre todos os periodontopatógenos avaliados e atividade

antiaderente sobre *F. nucleatum*. Sobre *P. gingivalis*, *P. intermedia*, *F. nucleatum* e *A. actinomycetencomitans* o ENM inibiu o crescimento bacteriano na concentração de  $15,6 \mu\text{g.mL}^{-1}$ , demonstrando que esse extrato tem grandes perspectivas microbiológicas no tratamento da periodontite.

Através da tabela 5 nota-se que apenas na concentração de  $7,8 \mu\text{g.mL}^{-1}$ ,  $100,15\% \pm 1,02$  das cepas de *F. nucleatum* conseguiram se aderir. Entre 1000 e  $500 \mu\text{g.mL}^{-1}$ , não houve bactérias aderidas, e de 250 a  $31,2 \mu\text{g.mL}^{-1}$  o percentual de bactérias aderidas variou de 2,22% a 4,10%. Dessa forma, esse extrato apresenta um amplo espectro inibitório sobre o *F. nucleatum*, uma bactéria que age diretamente no mecanismo de coagregação durante a formação do biofilme subgingival.

Apesar dos resultados mostrarem atividade *in vitro* sobre periodontopatógenos planctônicos e sobre biofilme monoespécie, é necessário elucidarmos que a formação do biofilme *in vivo* é bem diferenciada. A comunicação interbactérias através de moléculas autoindutoras (AI-2) e a matriz do biofilme, embora não sejam barreiras físicas significativas para a difusão dos extratos, podem retardar a penetração do agente. Por exemplo, fitoterápicos fortemente carregados ou quimicamente bastante reativos podem deixar de atingir as zonas mais profundas do biofilme, pois este funciona como um íon de troca removendo tais moléculas da solução (PERIASAMY, KOLENBRANDER, 2009).

Algumas espécies de *Croton* têm apresentado ação antimicrobiana sobre diversos microrganismos. Extratos obtidos da folha e da casca de *C. roxburgii* utilizando como solventes, acetona, metanol, etanol e água, foram eficazes contra bactérias Gram positivas e Gram negativas. Biopolímeros de quitosana, que utilizaram extratos de *C. lechleri* foram eficazes contra *P. gingivalis* e *A. actinomycetencomitans* em testes de difusão em ágar. Extratos hexânicos de *C. campestris* obtiveram efeito bacteriano sinérgico com aminoglicosídeos, sobre cepas de *Escherichia coli* resistentes a antibióticos, além de exibirem ação sobre *C. albicans* e *S. mutans*. Diterpenos isolados de *C. nepetaefolius* foram eficazes em testes com *S. mutans*, *S. mitis* e *S. sanguinis*, e na concentração de  $250 \mu\text{g/L}$  inibiram a aderência de *S. mutans* em placas de poliestireno, com um decréscimo de 94,28% das bactérias viáveis (RODRIGUEZ-GARCIA, GALAN-WONG, AREVALO-NIÑO, 2010; MATIAS et al., 2011; RATH et al., 2011; PEREIRA et al., 2011; CARDOSO et al., 2012.).

Tabela 4: Concentrações inibitórias mínimas (CIMs), em ( $\mu\text{g.mL}^{-1}$ ), do ENM frente a periodontopatógenos.

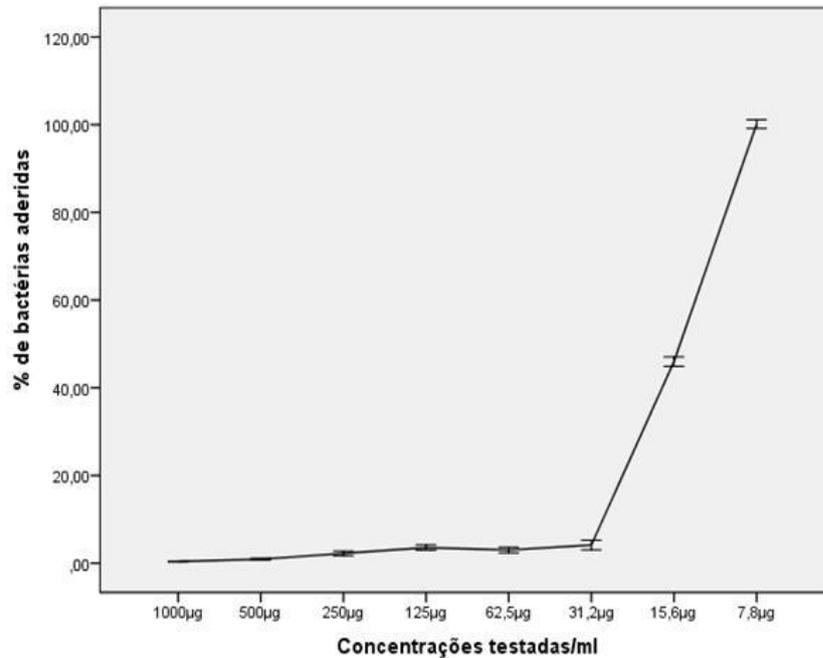
ENM	CIM ( $\mu\text{g.mL}^{-1}$ )			
	<i>P. gingivalis</i>	<i>P. intermedia</i>	<i>A. actinomycetencomitans</i>	<i>F. nucleatum</i>
	15,6	15,6	15,6	15,6

Tabela 5: Distribuição dos percentuais de *F. nucleatum* aderidas ao biofilme *in vitro* após tratamento com diversas concentrações do extrato nebulizado de *C. blanchetianus* Baill.

Concentrações testadas ( $\mu\text{g.mL}^{-1}$ )	Média (%)	Desvio-Padrão	Erro-Padrão
<b>1000</b>	0,36	0,08	0,04
<b>500</b>	0,91	0,20	0,12
<b>250</b>	2,22	0,53	0,31
<b>125</b>	3,50	0,61	0,35
<b>62,5</b>	3,01	0,63	0,63
<b>31,2</b>	4,10	1,09	0,61
<b>15,6</b>	45,98	1,07	0,57
<b>7,8</b>	100,15	1,02	0,65
<b>Meio de Cultura</b>	100,89	2,08	0,69

Na literatura, os estudos a cerca da atividade antimicrobiana de *C. blanchetianus* ainda são escassos, e no caso da sua avaliação sobre periodontopatógenos é inexistente nas bases Medline, LILACS e Bireme, sendo necessário que mais estudos sejam desenvolvidos para mostrarem o mecanismo de ação dos fitoconstituintes dessa planta, como o kaur-16-eno sobre esses patógenos. A presença de flavanas, como a epicatequina, pode estar relacionada com esse mecanismo, pois os grupos fenólicos hidroxilo apresentam afinidade para proteínas e atuam como inibidores de enzimas bacterianas, assim como interfere nas suas vias de síntese (ÁVILA et al., 2008; LI et al., 2012).

Figura 3: Percentual de *F. nucleatum* aderidos após 24 horas de tratamento com o extrato nebulizado de *C. blanchetianus* Baill em diferentes concentrações (em  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ).



Os resultados da citotoxicidade *in vitro* sobre macrófagos, evidenciados na figura 4 e na tabela 6, mostram que apenas entre 1000 e 500  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  os extratos de ENM reduziram o percentual de células viáveis, respectivamente para 13,23% ( $\pm 0,46$ ) e 17,04% ( $\pm 4,02$ ). Nas demais concentrações o percentual de células viáveis foi igual ou superior aos controles com DMEM. Entretanto, observa-se que quando se utilizou a amostra de 5  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ , houve um aumento significativo do número de células viáveis, o que pode estar relacionado com a redução do estresse oxidativo desencadeado por terpenos e monossacarídeos presentes nas amostras analisadas (STONE et al., 2014).

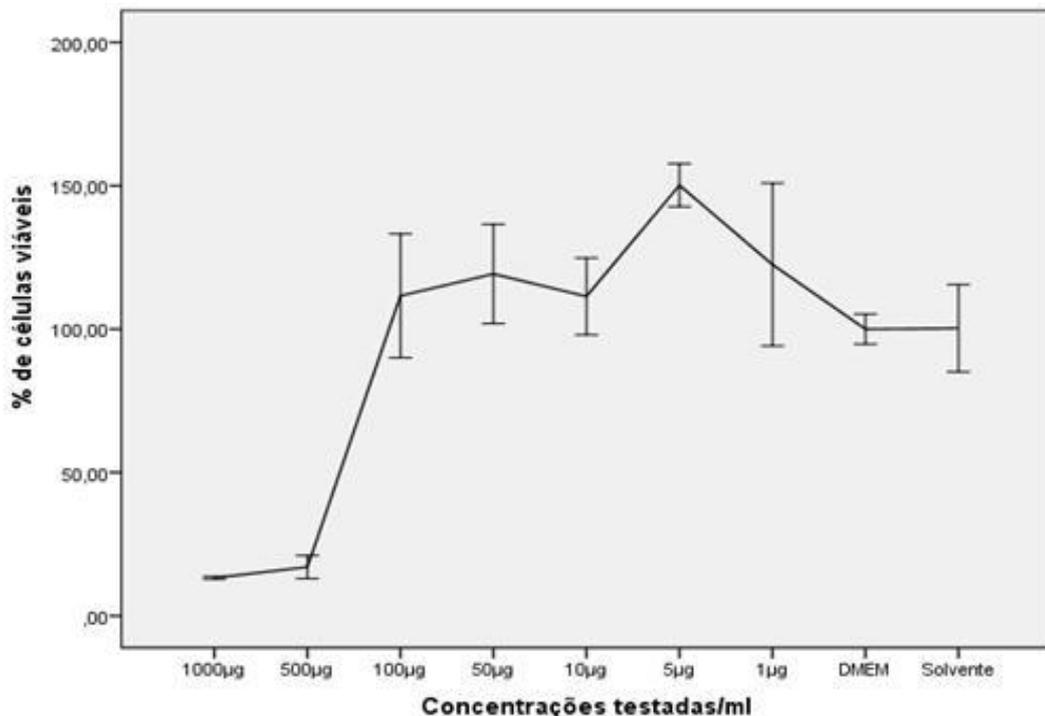
Tabela 6: Distribuição dos percentuais de macrófagos viáveis, após teste de citotoxicidade com diferentes concentrações do extrato nebulizado de *C. blanchetianus* Baill.

Concentrações testadas ( $\mu\text{g}/\text{mL}$ )	Média (%)	Desvio-Padrão	Erro-Padrão
<b>1000</b>	13,23	0,46	0,26
<b>500</b>	17,04	4,02	2,32
<b>100</b>	111,62	21,59	12,47
<b>50</b>	119,23	17,30	9,98
<b>10</b>	114,41	13,42	7,74
<b>5</b>	150,16	7,49	4,32
<b>1</b>	122,50	28,40	16,39
<b>DMEM</b>	100,01	5,22	3,01

Na avaliação da citotoxicidade de compostos presentes em plantas do gênero *Croton*, observou-se que diterpenos seco-entkaurenes apresentaram citotoxicidade sobre fibroblastos apenas no intervalo 2 a 25 $\mu$ M. Adicionalmente, a atividade citotóxica de desidrocrotoninas (DCTN), compostos presentes em diversas crotonóides, complexada a b-ciclodextrina foi testada sobre fibroblastos (V79) e hepatócitos. Com o objetivo de controlar a liberação desse composto foi observado que há uma diminuição da citotoxicidade da DCTN complexada (SUAREZ et al., 2009).

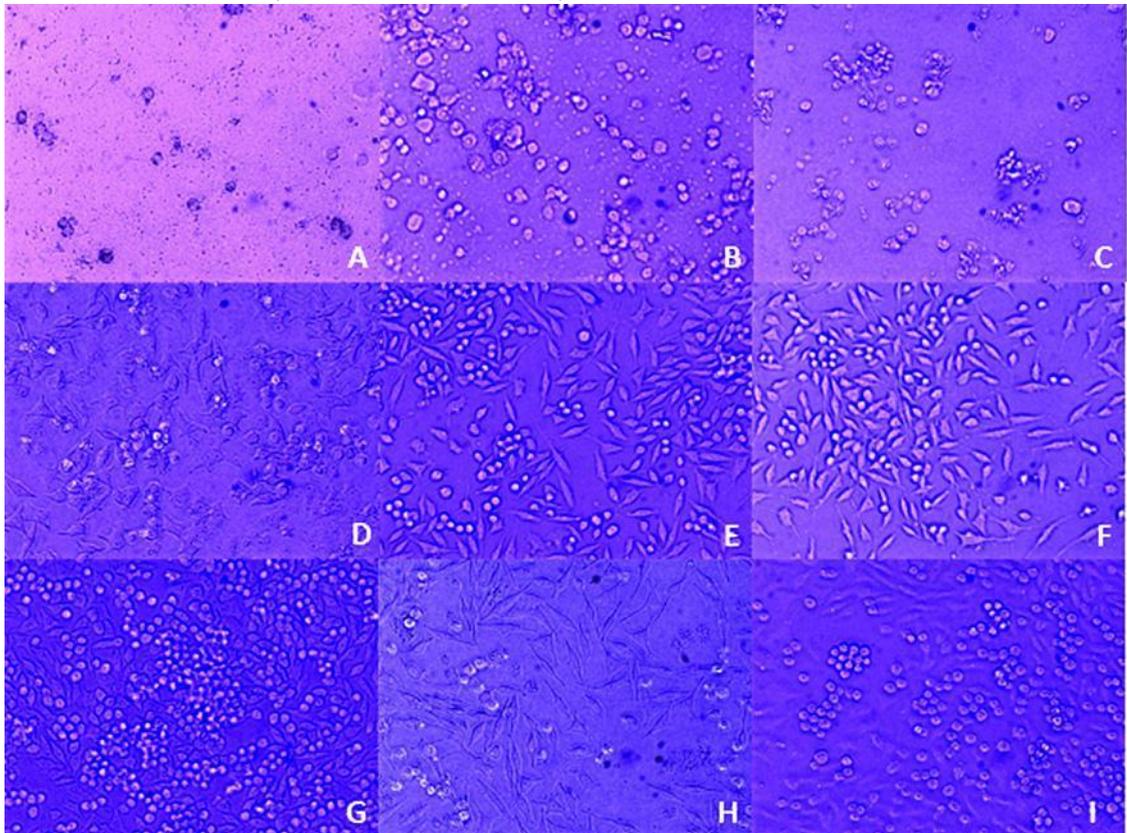
Estudos de viabilidade celular com macrófagos foram relatados na literatura com o intuito de demonstrar potenciais efeitos anti-inflamatórios de *Croton* sp. Como estas células estão envolvidas com a resposta imunes inata do organismo, produzindo mediadores pró inflamatórias, foram realizados testes *in vitro* para avaliar se extratos brutos ou isolados dessas espécies vegetais possuem potencial imunomodulador. Alguns compostos como a epicatequina, o ribitol e o ácido hexadecanóico, identificados por CG-EM nas amostras de ENM, são relatados como agentes moduladores da resposta inflamatória induzida por lipopolissacarídeos em macrófagos (Yu et al., 2010; GARCIA-LAFUENTE et al., 2014; LI et al., 2014).

Figura 4: Diagrama apresentando a percentagem e desvio-padrão de macrófagos RAW 264,7 viáveis após 48 horas de tratamento, com diferentes concentrações de extrato nebulizador de *C. blanchetianus* Baill.



De acordo com o Órgão Internacional de Padronização (*International Standard Organization*), ISO 10993, o ensaio de citotoxicidade *in vitro* é o primeiro teste a ser realizado para avaliar a biocompatibilidade de qualquer material ou fitoterápico para uso biomédico. Posteriormente, comprovada a sua não toxicidade, os estudos de biocompatibilidade da planta podem prosseguir, realizando-se ensaios laboratoriais com animais (ROGERO et al., 2003).

Figura 5: Fotomicrografias das culturas de macrófagos RAW 269.7, após 48 horas de tratamento, com diferentes concentrações do ENM com resolução de 100x; A:  $1000 \mu\text{g.mL}^{-1}$ ; B:  $500 \mu\text{g.mL}^{-1}$ ; C:  $100 \mu\text{g.mL}^{-1}$ ; D:  $50 \mu\text{g.mL}^{-1}$ ; E:  $10 \mu\text{g.mL}^{-1}$ ; F:  $5 \mu\text{g.mL}^{-1}$ ; G:  $1 \mu\text{g.mL}^{-1}$ ; H: DMEM; I: Solvente (DMEM + álcool 20%).



Na avaliação da toxicidade aguda e crônica de extratos etanólicos, parcialmente purificados, de *C. stellatopilasus*, observou-se, em ensaios animais com ratos Wistar, que plantas pertencentes ao gênero *Croton* possuem baixa toxicidade. Verificou-se que quando foram administradas a dose letal média de  $10,25 \text{ g.kg}^{-1}$  e a dose potencialmente crônica de  $100 \text{ mg.kg}^{-1} \cdot \text{dia}^{-1}$ , durante 6 meses, não houve mortalidade nem sinais clínicos de toxicidade nos animais (CHAOTHAM et al, 2013).

No teste de toxicidade aguda, que foi realizado em ratos Wistar, utilizando uma dose única de  $2 \text{ g.kg}^{-1}$ , os animais foram acompanhados ao longo de 14 dias, verificando-se que o ENM não induziu à morte em nenhum animal. Na evolução ponderal da análise foi observado ganho significativo no grupo das fêmeas em relação ao controle (tabela 7), o que não infere em toxicidade, visto que as alterações no peso corporal e no peso dos órgãos podem ser um indicador de efeitos adversos promovidos pela droga quando o animal perde mais que 10% do peso corpóreo inicial (RAZA et al., 2002; TEO et al., 2002).

Os riscos de toxicidade relacionada a plantas fitoterápicas desconhecidas da comunidade científica podem ser avaliados por meio de estudos toxicológicos pré-clínicos, sejam eles *in vitro* ou *in vivo*. Em relação aos estudos pré-clínicos *in vivo*, a toxicidade aguda é um dos principais testes com o qual é possível observar sinais de intoxicação, determinar a  $DL_{50}$ , conforme preconizado pela RE Nº 90/2004, e definir doses a serem usadas em estudos posteriores (MONTENEGRO, 2011).

Foi observada uma diminuição significativa no consumo de ração nos machos, bem como uma ingestão inferior de água nas fêmeas em relação aos controles (tabela 7). Apesar de serem parâmetros importantes no estudo da segurança de um produto com finalidade terapêutica não se pode inferir toxicidade ao extrato (IVERSEN, NICOLAYSEN, 2003). Em relação aos parâmetros bioquímicos e hematológicos apresentados nas tabelas 8 e 9, respectivamente, pode-se observar que não houve significância estatística dos grupos-testes quando comparados aos controles. Portanto não houve o desencadeamento de repostas inflamatórias sistêmicas, que poderiam ser visualizadas durante os exames hematológicos.

Alterações na massa relativa dos órgãos possuem uma estreita relação com sinais de toxicidade conforme descrito por Dallegrave (2003). Na perspectiva de se comprovar essa teoria, o peso dos órgãos foi avaliado ao término do ensaio de toxicidade aguda e foi observado que o ENM alterou positivamente o peso relativo do baço das fêmeas, havendo diferença estatisticamente significativa em relação ao controle, tais dados estão apresentados na tabela 7. Para avaliar se essas diferenças no peso do baço entre os grupos-teste e controle estão vinculadas a alterações microscópicas decorrentes de efeitos tóxicos do ENM, esses órgãos foram submetidos à análise histopatológica. Secções transversais feitas no baço e coradas por HE mostraram que não houve diferenças entre os padrões celulares na organização das estruturas histológicas dos órgãos, não havendo, portanto alterações celulares nas estruturas da polpa branca e da polpa vermelha como se visualiza nas figuras 6 e 7.

Tabela 7: Efeito da administração via oral do extrato nebulizado de *C. blanchetianus* Baill. na evolução ponderal, peso dos órgãos, consumo de ração e água em ratos Wistar albinos adultos durante 14 dias.

Parâmetros	Sexo	Tratamentos		Significância (p)
		Controle (10 mL.kg <sup>-1</sup> )	Teste (2000 mg.kg <sup>-1</sup> )	
Evolução Ponderal				
<i>Machos</i>				
Início (g)		190±17	184±15	
Final (g)		248±13	224±23	0,222
Ganho percentual (%)		29±12	22±9,1	
<i>Fêmeas</i>				
Início (g)		177±12	159±14	
Final (g)		189±11	182±17	0,008*
Ganho percentual (%)		6,9±2,7	14±5,4	
Peso relativo dos órgãos (g/100g)				
<i>Machos</i>				
Fígado		3,4±0,13	3,4±0,12	1,0
Baço		0,38±0,03	0,34±0,05	0,115
Coração		0,36±0,04	0,36±0,05	0,914
Rins		0,78±0,09	0,73±0,08	1,0
<i>Fêmeas</i>				
Fígado		3±0,23	3,3±0,26	0,095
Baço		0,36±0,03	0,44±0,05	0,008*
Coração		0,38±0,07	0,39±0,06	0,753
Rins		0,73±0,11	0,73±0,06	0,4633
Consumo de ração (g)				
	<i>Machos</i>	127±11	102±26	0,002*
	<i>Fêmeas</i>	75±10	74±24	0,434
Consumo hídrico (mL)				
	<i>Machos</i>	260±30,88	261,1±32,14	0,576
	<i>Fêmeas</i>	151,4±30,85	118,1±39,84	0,032*

(\*) Valores de p<0.05 foram considerados significativos no teste de Mann-Whitney.

Figura 6: Fotomicrografias de cortes transversais do tecido esplênico de fêmeas de ratos Wistar (Grupo-Controle) coradas em hematoxilina-eosina (HE). A: (HE, 40X); B (Polpa branca; HE, 100X); C e D: (Polpa Vermelha; HE, 100X).

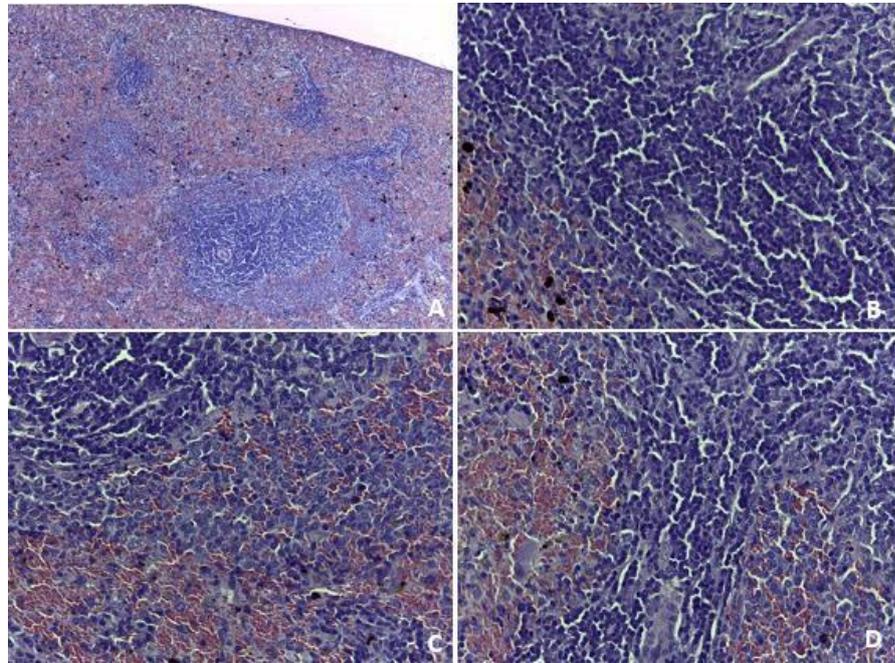
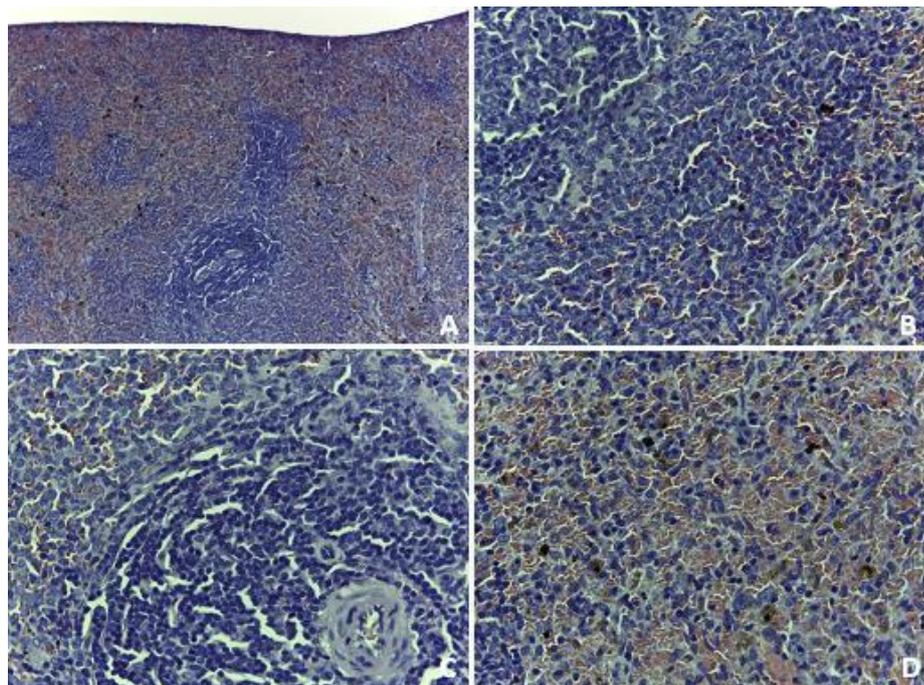


Figura 7: Fotomicrografias do tecido esplênico de fêmeas de ratos Wistar (Grupo-Teste) submetidas ao teste de toxicidade aguda. Cortes transversais corados em hematoxilina-eosina (HE). A: (HE, 40X); B e D: (Polpa vermelha; HE, 100X); C (Polpa Branca; HE, 100X).



Apesar das alterações observadas, nas condições relatadas, não é possível inferir toxicidade ao extrato. Dessa maneira, é possível sugerir que o ENM na dose de  $2 \text{ g.kg}^{-1}$  apresentou indícios de baixa toxicidade, com alterações em parâmetros isolados, o que confere segurança na continuidade do estudo, passando a serem investigadas as propriedades farmacológicas da espécie em questão.

Tabela 8: Distribuição dos parâmetros bioquímicos em ratos tratados com o extrato nebulizado de *C. blanchetianus* Baill, após 14 dias.

Parâmetros	Sexo	Grupos		p-valor
		Controle ( $10 \text{ mL.kg}^{-1}$ )	Teste ( $2000 \text{ mg.kg}^{-1}$ )	
<i>Machos</i>				
Glicose (mg/dL)		90±23	106±36	0,286
Triglicerídeos (mg/dL)		97±25	58±24	0,2
Colesterol total (mg/dL)		59±15	54±10	0,709
HDL-colesterol (mg/dL)		15±4,4	17±0,13	0,190
AST (U/L)		213±18	214±36	1,0
ALT (U/L)		62±15	63±11	1,0
Creatinina (mg/dL)		0,31±0,08	0,44±0,11	0,138
Ácido úrico (mg/dL)		0,46±0,24	1,2±1,2	0,629
Uréia (mg/dL)		55±9,3	55±19	0,857
<i>Fêmeas</i>				
Glicose (mg/dL)		121±27	110±23	0,886
Triglicerídeos (mg/dL)		52±16	68±18	0,885
Colesterol total (mg/dL)		60±5,6	56±1,7	0,7
HDL-colesterol (mg/dL)		17±2,5	20±1,5	0,268
AST (U/L)		185±16	322±39	0,1
ALT (U/L)		37±9	51±12	0,229
Creatinina (mg/dL)		0,32±0,05	0,51±0,15	0,228
Ácido úrico (mg/dL)		0,19±0,01	0,82±0,73	0,1
Uréia (mg/dL)		43±12	41±13	0,856

(\*) Valores de  $p < 0.05$  foram considerados significativos no teste Mann-Whitney.

Tabela 9: Distribuição dos parâmetros hematológicos em ratos Wistar, tratados com o extrato nebulizador de *C. blanchetianus* Baill, após 14 dias.

Parâmetros	Sexo	Grupos		p-valor
		Controle (10 mL/kg)	Teste (2000 mg/kg)	
<i>Machos</i>				
Hemácias ( $\times 10^6/\text{mm}^3$ )		7,6 $\pm$ 0,18	7,2 $\pm$ 0,46	0,4
Hemoglobina (g/dL)		14 $\pm$ 1,2	14 $\pm$ 0,77	0,857
Hematócrito (%)		43 $\pm$ 1,9	42 $\pm$ 2,8	0,4
Leucócitos ( $\times 10^3/\text{mm}^3$ )		8,1 $\pm$ 2,1	8,5 $\pm$ 2,5	0,886
Linfócitos (%)		77 $\pm$ 5	74 $\pm$ 2,8	0,561
Neutrófilos (%)		20 $\pm$ 2,3	20 $\pm$ 0,5	0,854
Eosinófilos (%)		1 $\pm$ 0,08	1 $\pm$ 0,07	0,976
Basófilos (%)		2,3 $\pm$ 0,96	1,3 $\pm$ 0,5	0,161
Monócitos (%)		2,5 $\pm$ 0,58	2,7 $\pm$ 0,58	0,838
Plaquetas ( $\times 10^3/\text{mm}^3$ )		705 $\pm$ 14	781 $\pm$ 58	0,114
<i>Fêmeas</i>				
Hemácias ( $\times 10^6/\text{mm}^3$ )		6,4 $\pm$ 0,57	6,8 $\pm$ 0,15	0,486
Hemoglobina (g/dL)		13 $\pm$ 0,81	14 $\pm$ 1,1	0,85
Hematócrito (%)		37 $\pm$ 2,8	39 $\pm$ 1,6	0,41
Leucócitos ( $\times 10^3/\text{mm}^3$ )		7,7 $\pm$ 1,8	7,2 $\pm$ 0,8	0,4
Linfócitos (%)		75 $\pm$ 0,96	76 $\pm$ 0,5	1,0
Neutrófilos (%)		19 $\pm$ 2	19 $\pm$ 1	0,825
Eosinófilos (%)		1 $\pm$ 0,82	0,25 $\pm$ 0,05	0,206
Basófilos (%)		2 $\pm$ 0,82	2 $\pm$ 0,67	0,876
Monócitos (%)		3 $\pm$ 0,82	3,5 $\pm$ 0,5	0,459
Plaquetas ( $\times 10^3/\text{mm}^3$ )		523 $\pm$ 88	653 $\pm$ 55	0,2

(\*) Valores de  $p < 0.05$  foram considerados significativos no teste Mann-Whitney.

A análise dos parâmetros bioquímicos, expostos na tabela 8, fornecem dados importantes na avaliação da toxicidade das amostras de ENM. A análise das enzimas transaminases (ALT e AST) e da fosfatase alcalina (FAL) são importantes indicadores de lesões nas células hepáticas. As transaminases estão amplamente distribuídas nos tecidos, estando,

predominantemente, presente no citosol e mitocôndrias de hepatócitos. A FAL é uma enzima fosfohidrolase, encontrada em maior proporção no fígado e no epitélio do trato biliar. Como geralmente qualquer hepatopatia ativa pode aumentar os valores de FAL, essa enzima pode ser um marcador importante da atividade da membrana plasmática e do retículo endoplasmático durante tratamentos farmacológicos. O aumento na atividade sérica dessas enzimas pode ocorrer em condições de colestase, intra e extra-hepática, induzida por drogas e hormônios. Portanto, tais enzimas podem fornecer uma avaliação quantitativa do grau de danos sofridos pelos hepatócitos; como neste estudo não houve alteração de nenhum desses parâmetros séricos, sugere-se que esse extrato, no teste de toxicidade aguda, não induz danos hepáticos (AL-HABORI et al., 2002).

#### 4. CONCLUSÕES

---

Os resultados da análise química evidenciaram compostos com potencial terapêutico aplicável à periodontia, como o kaur-16-eno e a epicatequina. Quanto ao aspecto biológico, o extrato nebulizado de *Croton blanchetianus* Baill apresentou atividade inibitória frente aos periodontopatógenos testados e também inibiu a adesão de *Fusobacterium nucleatum*, na concentração de  $31,2 \mu\text{g.mL}^{-1}$ . Portanto, esse extrato apresenta efetividade no controle do biofilme, possuindo amplas perspectivas na terapêutica das doenças periodontais, sem evidências de citotoxicidade em testes in vitro que apontaram que concentrações do ENM inferiores à  $100 \mu\text{g. mL}^{-1}$  não foram citotóxicas em linhagens de macrófagos RAW 269.7. Além disso, os testes de toxicidade aguda, na dose de  $2 \text{ g.kg}^{-1}$ , mostraram que essa planta não causou morte em nenhum animal testado, e não alterou nenhum dos parâmetros bioquímicos e hematológicos analisados.

#### REFERÊNCIAS

---

Albuquerque UP, Medeiros PN, Almeida ALS, Monteiro JM, Neto EMF Melo JG, Santos JP. Medicinal plants of the caatinga (semi-arid) vegetation of NE Brazil: A quantitative approach. J Ethnopharmacol 2007; 114: 325–354.

Al-Habori M, Al-Aghbari A, Al-Mamary M, Baker M. Toxicological evaluation of *Catha edulis* leaves: a long term feeding experiment in animals. *J Ethnopharmacol* 2002; 83(3): 209-17.

Almeida RN, Falcão ACGM, Diniz RST, Quintans-Júnior LJ, Polari RN, et al. Metodologia para avaliação de plantas com atividade no Sistema Nervoso Central e alguns dados experimentais. *Rev Bras Farm* 1999; 80: 72-76.

Ávila PH, Smania EFA, Monache FD, Júnior A S. Structure – activity relationship of antibacterial chalcones. *Bioorg Med Chem* 2008; 16: 9790-9794.

Bedran TBL, Nogueira MNM, Spolidorio LC, Estrela C, Spolidorio DMP. Patógenos Periodontais: Comparação entre Cultura Bacteriana e PCR em Tempo Real para Teste Diagnóstico. *Robrac* 2010; 19(50): 187-191.

Beutler B, Hoebe K, Du X, Ulevitch RJ. How we detect microbes and respond to them: the Toll-like receptors and their transducers. *J Leukoc Biol* 2003; 74: 479-485.

Bonifait L, Marquis A, Genovese S, Epifano F, Grenier D. Synthesis and antimicrobial activity of geranyloxy- and farnesyloxy-acetophenone derivatives against oral pathogens. *Fitoterapia* 2012; 83(6): 996-999.

Byrne SJ, Dashper SJ, Darby IB, Adams GG, Hoffmann, Reynolds EC. Progression of chronic periodontitis can be predicted by the levels of *P. gingivalis* and *T. denticola* in supragingival plaque. *Oral Microbiol Imm* 2009; 24: 01-09.

Cardoso Sá N, Cavalcante TT, Araújo AX, dos Santos HS, Albuquerque MR, Bandeira PN, da Cunha RM, Cavada BS, Teixeira EH. Antimicrobial and antibiofilm action of Casbane Diterpene from *Croton nepetaefolius* against oral bacteria. *Arch Oral Biol* 2012; 57(5): 550-555.

Cartaxo AL, Souza MMA, Albuquerque UP. Medicinal plants with bioprospecting potential used in semi-arid northeastern Brazil. *J Ethnopharmacol* 2010; 131: 326–342.

Chaotham C, Chivapat S, Chaikitwattana A, De-Eknamkul W. Acute and chronic oral toxicity of a partially purified plaunotol extract from *Croton stellatopilosus* Ohba. *Biomed Res Int* 2013; article ID 2013:303162.

CLSI, *Clinical and Laboratory Standards Institute*. Metodologia dos Testes de Sensibilidade a Agentes Antimicrobianos por Diluição para Bactéria de Crescimento Anaeróbico, 2008.

Dallegrave E. Toxicidade reprodutiva do herbicida glifosato – Roundup em ratos Wistar. 225 f. Tese (Doutorado) – Programa de Pós-graduação em Ciências Veterinárias, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 2003.

Darveau RP, Tanner A, Page RC. The microbial challenge in periodontitis. *Periodontol* 2000 1997; 14: 12-32.

Fine DH, Markowitz K, Furgang D, Fairlie K, Ferrandiz J, et al. Macrophage inflammatory protein 1-a: a salivary biomarker of bone loss in a longitudinal cohort study of children at risk for aggressive periodontal disease? *J Periodontol* 2009; 80: 106–113.

Fine DH, Markowitz K, Fairlie K, Tischio-Bereski D, Ferrandiz J, Godbole D, Furgang D, Gunsolley J, Best A. Macrophage inflammatory protein-1 $\alpha$  shows predictive value as a risk marker for subjects and sites vulnerable to bone loss in a longitudinal model of aggressive periodontitis. *PLoS One* 2014; 9(6):e98541.

García-Lafuente A, Moro C, Manchón N, Gonzalo-Ruiz A, Villares A, Guillamón E, Rostagno M, Mateo-Vivaracho L. In vitro anti-inflammatory activity of phenolic rich extracts from white and red common beans. *Food Chem* 2014; 161:216-223.

Georgetti SR, Casagrande R, De Souza CRF, de Oliveira WP, Fonseca MJV. Spray drying of the soybean extract: effects on chemical properties and antioxidant activity. *Food Sci Technol* 2008; 41: 1521-1527.

Guggenheim B, Giertsen W, Schupbach P, Shapiro S. Validation of an *in vitro* biofilm model of supragingival plaque. *J Dent Res* 2001; 80(1): 363–70.

Iversen PO, Nicolaysen G. Water-for life. *Tidsskrift for den Norske Laegeforening* 2003; 123: 3402-3405.

Jagannathan R, Lavu V, Rao SR. Comparison of the Proportion of Non-Classic (CD14+CD16+) Monocytes/Macrophages in Peripheral Blood and Gingiva of Healthy Individuals and Patients With Chronic Periodontitis. *J Periodontol* 2014 Jun; 85(6): 852-8.

Hernández DM et al. Entrachyloban-19-oic acid isolated from *Iostephane heterophylla* as a promising antibacterial agent against *Streptococcus mutans* biofilms. *Fitoterapia* 2012; 83(3): 527-531.

Holt S, Ebersole J. *Porphyromonas gingivalis*, *Treponema denticola*, and *Tannerella forsythia*: the “red complex” a prototype polybacterial pathogenic consortium in periodontitis. *Periodontology* 2000 2005; 38: 72-122.

Hosry L. et al. In vitro cytotoxic and anticlastogenic activities of saxifragifolin B and cyclamin isolated from *Cyclamen persicum* and *Cyclamen libanoticum*. *Pharm Bio*, Epub 2014 Mar 20.

Islam B, Khan SN, Naeem A, Sharma V, Khan AU. Novel effect of plant lectins on the inhibition of *Streptococcus mutans* biofilm formation on saliva-coated surface. *J Appl Microbiol* 2009; 106: 1682–1689.

Li, Y, Luo Y, Hu Y, Zhu DD, Zhang S, Liu ZJ, Gong HB, Zhu HL. Design, synthesis and antimicrobial activities of nitroimidazole derivatives containing 1,3,4 – oxadiazole scaffold as FabH inhibitors. *Bioorg MedChem* 2002; 20: 4316-22.

Li J, Yu G, Fan J. Alditols and monosaccharides from sorghum vinegar can attenuate platelet aggregation by inhibiting cyclooxygenase-1 and thromboxane-A<sub>2</sub> synthase. *J Ethnopharmacol* 2014; S0378-8741(14): 387-390.

Matias EF, Santos KK, Almeida TS, Costa JG, Coutinho HD. Phytochemical prospection and modulation of aminoglycoside antibiotic activity by *Croton campestris*. *A Chemotherapy*. 2011; 57(4): 305-309.

O’Neil MJ. *The Merck Index: An Encyclopedy of chemicals drugs and biological*. 15<sup>a</sup> Edição. New Jersey: Merck, 2013.

Montenegro CA. Atividade gastroprotetora de *Xylopija langsdorffiana* A. St.-Hil. & Tul. (Annonaceae) em modelos animais. Dissertação (mestrado) - Programa de Pós-Graduação em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos, Universidade Federal da Paraíba (UFPB), João Pessoa, 2011.

Pereira EM, Gomes RT, Freire NR, Aguiar EG, Brandão Md, Santos VR. In vitro antimicrobial activity of Brazilian medicinal plant extracts against pathogenic microorganisms of interest to dentistry. *Planta Med* 2011 Mar; 77(4): 401-404.

Periasamy S., Kolenbrander P. E. Mutualistic biofilm communities development with *Porphyromonas gingivalis* and initial, early, and late colonizers of enamel. *J Bacteriol* 2009; 191: 6804-6811.

Rath S, Patra JK, Mohapatra N, Mohanty G, Dutta S, Thatoi H. In Vitro Antibacterial and Antioxidant Studies of *Croton roxburghii* L., from Similipal Biosphere Reserve. *Indian J Microbiol*. 2011; 51(3): 363-368.

Raza M, Al-Shabanah AO, El-Hadiyah TM, Al-Majed AA. Effect of prolonged vigabatrin treatment of hematological and biochemical parameters in plasm, liver and kidney of Swiss albino mice. *Scientia Phamraceutica* 2002; 70:135-145.

Rodriguez-Garcia A, Galan-Wong LJ, Arevalo-Niño K. Development and *in vitro* evaluation of biopolymers as a delivery system against periodontopathogen microorganisms. *Acta Odontol Latinoam* 2010;23(2):158-63.

Soares LAL, Gonzalez-Ortega G, Petrovick PR, Schimidt PR. Dry granulation and compression of spray-dried plant extracts. *AAPS Pharm Sci Tech* 2005; 6:359-366.

Stepanovic S, Vukovic D, Dakic I, Savic B, Svabic-Vlahovic M. A modified microtiterplate test for quantification of staphylococcal biofilm formation. *J Microbiol Methods* 2000; 40(2): 175–179.

Stone V, Kudo KY, August PM, Marcelino TB, Matté C. Polyols accumulated in ribose-5-phosphate isomerase deficiency increase mitochondrial superoxide production and improve antioxidant defenses in rats' prefrontal cortex. *Int J Dev Neurosci* 2014; 37:21-25.

Suárez AI, Chavez K, Mateu E, Compagnone RS, Muñoz A, Sojo F, Arvelo F, Mijares M, De Sanctis JB. Cytotoxic activity of seco-entkaurenes from *Croton caracasana* on human cancer cell lines. *Nat Prod Commun* 2009; 4(11):1547-1550.

Teo S, Stirling D, Thomas S, Hoberman A, Kiorpes A, Khetani V. A 90-day oral gavage toxicity study of d-methylphenidate and d,l-methylphenidate in Sprague Dawley rats. *Toxicol* 2002; 179:183-196.

Yu CC, Cgen HW, Chang YC, Chien SC, Kuo YK, et al. Chemical composition and bioactivities of the marine alga *Isochrysis galbana* from Taiwan. *Nat Prod Commun* 2010; 5(12): 1941-1944.

Zetola ML, Sonaglio D, Gonzalez-Ortega G, Limberger RP, Petrovick PR, Bassani VLC. Activities of liquid and spray-dried extracts from *Lippia alba* – Verbenaceae (Brazilian false melissa). *Journal of ethnopharmacology* 2002; 82: 207-215

Zimmermann M. Ethical guidelines for investigations of experimental pain in conscious animals. *Pain* 1983; 16(2): 109-110.

## CAPÍTULO III

---

SOUZA, Emmanuel Albuquerque de. **Avaliação do potencial antimicrobiano sobre periodontopatógenos, dos aspectos citotóxicos e químicos de extratos de *Croton blanchetianus* Baill obtidos por diferentes técnicas.** Campina Grande-PB: UEPB, 2014. 160p.(Dissertação – Mestrado em Odontologia).

### RESUMO

A aplicação de fitoterápicos no tratamento das doenças periodontais evidencia que plantas medicinais são fontes de muitos fitocompostos, que podem ser extraídos por diferentes métodos extrativos. Esta pesquisa objetivou avaliar o potencial antimicrobiano sobre periodontopatógenos, a atividade citotóxica e variações nas características químicas e termoanalíticas de extratos de *Croton blanchetianus* Baill, obtidos por diferentes métodos de extração. Extratos etanólicos obtidos da casca da planta por ultrassom (ELU), maceração (ELM) e turbólise (ELT) foram liofilizados. Para análise química foram utilizadas a Cromatografia Gasosa acoplada a Espectrometria de Massas (CG-EM) e análises Termoanalíticas. Na atividade antibacteriana foram determinadas as concentrações inibitórias mínimas (CIMs) sobre *Streptococcus mutans*, *S. oralis*, *S. parasanguinis*, *S. salivarius*, *Porphyromonas gingivalis*, *Prevotella intermedia*, *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* e *Fusobacterium nucleatum*; para esta última bactéria também foi avaliada a atividade antibiofilme. Na citotoxicidade *in vitro*, foram realizados ensaios de viabilidade celular com macrófagos RAW 264.7. Os resultados apontaram que as amostras apresentaram os mesmos constituintes, mas estes foram detectados em menor quantidade no ELT. As menores CIMs, de  $15,6 \mu\text{g.mL}^{-1}$ , foram verificadas em todos os extratos para *P. gingivalis*, *P. intermedia* e *F. nucleatum*. Todos os extratos também apresentaram atividade antibiofilme, sem diferença entre as amostras de ELU, ELM e ELT ( $p>0,05$ ). Na concentração de  $50 \mu\text{g.mL}^{-1}$ , apenas o ELT não reduziu, significativamente, a viabilidade celular. Portanto, apesar das amostras ELT, ELU e ELM apresentarem os mesmos fitoconstituintes, o ELT os apresenta em menor quantidade e ainda possui a mesma atividade antibacteriana e menor citotoxicidade.

## 1. INTRODUÇÃO

---

As atividades biológicas investigadas, utilizando tanto óleos essenciais, como extratos ou frações, de espécies de *Croton*, principalmente as constituídas de alcalóides e compostos fenólicos, apontam grandes perspectivas na utilização desse fitoterápico. O diterpeno clerodano trans-desidrocrotonia (DCTN), isolado de *C. cajucara*, apresentou diversas atividades como hipoglicêmica, hipolipidêmica, antigenotópica, antiulcerogênica, antitumoral, antiinflamatória, antinociceptiva, antiestrogênica e cardiovascular. Ensaios com flavonóides extraídos dessa mesma espécie também apresentaram atividade antiinflamatória e antioxidante (COSTA et al., 2007; NARDI et al., 2007).

A família Euphorbiaceae compreende uma das mais extensas famílias das angiospermas, abrangendo cerca de 7.500 espécies, representadas por 300 gêneros. Entre os gêneros da família Euphorbiaceae com potencial uso farmacológico, destaca-se o gênero *Croton* por seu expressivo número de espécies (1200) distribuídas em todas as regiões tropicais e subtropicais. No Brasil ocorrem 72 gêneros e cerca de 1.100 espécies, de habitat diferentes, difundidas em todos os tipos de vegetação (PALMEIRA, 2005).

Na avaliação da atividade antimicrobiana de *Croton campestris* sobre patógenos orais como *Streptococcus mutans* e *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, concluiu-se que as frações hexânica, butânica e etanólica têm efetividade *in vitro*. Estes resultados sugerem que outras plantas pertencentes ao gênero *Croton* sp. podem ser importantes alternativas terapêuticas às doenças periodontais (PATERNITI et al., 2010; PEREIRA et al., 2011).

As doenças periodontais são consideradas processos inflamatórios que acometem os tecidos de sustentação dos dentes, desencadeada por bactérias do biofilme subgingival, denominadas de periodontopatógenos, que possuem a capacidade de induzir manifestações inflamatórias deletérias aos tecidos periodontais. Estima-se que cerca de 51,3% da população brasileira, entre 33 e 46 anos, possui perda de inserção periodontal, manifestando várias formas de periodontites. A aplicação de fitoterápicos no tratamento das doenças periodontais evidencia que plantas medicinais são fontes de muitos fitocompostos, e que os seus mecanismos de ação ainda precisam ser elucidados para tornar os resultados das pesquisas publicadas, mais consistentes (SOCRANSKI, SMITH, HAFFAJEE, 2002; PASICH et al., 2013; BRASIL, 2012).

O uso de fitoterápicos com finalidade profilática, curativa, paliativa ou com fins de diagnóstico passou a ser oficialmente reconhecido pela Organização Mundial de Saúde (OMS)

em 1978, quando recomendou a difusão mundial dos conhecimentos necessários para o seu uso. Considerando-se as plantas medicinais importantes instrumentos da assistência farmacêutica, várias resoluções da OMS expressam a posição do organismo a respeito da necessidade de valorizar o uso desses medicamentos (WHO, 2000; BRASIL, 2008).

Na pesquisa com fitoterápicos, algumas das principais fontes de erros durante o processo analítico estão na fase de preparação dos extratos. Os solventes utilizados na extração não devem ser tóxicos e não podem influenciar na estabilidade dos fitoconstituintes. Os métodos de extração devem ser adequados, de forma que se otimize o tempo de extração, a quantidade e os tipos de compostos bioativos relacionados com a atividade farmacológica avaliada (ARCEUZ, WESOLOWSKI, KONIECZYNSKI, 2013).

Então, considerando as potencialidades terapêuticas das euforbiáceas no tratamento de doenças periodontais e a falta de estudos que avaliem a influência dos vários tipos de extração nas características dos fitoterápicos; Esta pesquisa objetivou avaliar o potencial antimicrobiano sobre periodontopatógenos, a atividade citotóxica e variações nas características químicas e termoanalíticas de extratos de *Croton blanchetianus* Baill, obtidos por diferentes métodos de extração.

## 2. MATERIAIS E MÉTODOS

---

### 2.1. Coleta e identificação do material vegetal

Amostras da casca da planta foram coletadas no estado da Paraíba, região nordeste do Brasil, na microrregião dos Cariris, no município de Aroeiras, com as seguintes coordenadas – Latitude: 7,543798/7°32'37,67''S; Longitude: -5,746061/35°44'45,82''W. Foram selecionadas espécies adultas com auxílio de um botânico especializado em plantas da caatinga, na estação conhecida como alto verão, que se estende de setembro a fevereiro respeitando-se o horário ideal de coleta. Foram realizadas exsiccatas, para identificação e verificação da autenticidade botânica do *Croton blanchetianus* Baill., seguido de depósito, com tombamento nº 4946, no herbário do Centro de Ciências Tecnológicas e Rurais (CCTR) da Universidade Federal de Campina Grande (UFCG). Após a coleta da planta, as amostras da casca da planta foram colocadas em estufa de circulação de ar Fanem R 330, e após a estabilização do peso foram pulverizadas em moinho de facas SOLAB<sup>®</sup>, obtendo-se partículas de 10 mesh.

## 2.2. Obtenção dos extratos vegetais

Extratos etanólicos foram produzidos na proporção vegetal: solvente de  $0,14 \text{ g.L}^{-1}$ , por três métodos de extração:

- Maceração (ELM), na qual a matéria vegetal e o solvente permanecem em contato estático por 5 dias, com eventuais agitações;
- Ultrassom (ELU), na qual as amostras são sonicadas durante 1 hora, a  $35 \pm 1$  °C, utilizando o aparelho Unique Ultrasonic Cleaner<sup>®</sup>;
- Turbólise (ELT), no qual as amostras são agitadas durante 15 minutos, a 6000 rpm, no aparelho IKA T10 Turrax<sup>®</sup>.

Os extratos líquidos foram evaporados à vácuo em Rotaevaporador, IKA RV 10<sup>®</sup>, e em seguida liofilizados, em Heto Power Dry LL 1500<sup>®</sup>, para remover a maior quantidade possível de solventes. Desse modo, foram obtidos extratos liofilizados por três métodos extrativos diferentes.

## 2.3. Cromatografia Gasosa acoplada a Espectrômetro de Massas (CG-EM)

Para avaliação química quantitativa e qualitativa utilizou-se o aparelho CG-MS – QP 2010<sup>®</sup>, com o detector da fonte de íons a 200 °C e a interface a 280 °C, em modo scan: 40 – 80 m/z. Utilizou-se uma coluna RTX SMS<sup>®</sup>, de 30m de comprimento, 0,25 mm de diâmetro interno e 0,25 µm de tamanho de partícula, com forno a 80 °C; o gás de injeção foi o He (hélio) a um fluxo de  $1 \text{ mL.min}^{-1}$ .

A amostra foi submetida a uma pressão de 65 kPa, com velocidade linear de 36,8 cm/s; no modo de injeção Split, na razão de 1:50, com volume de injeção de 0,3 µL, em um tempo de corrida de 63 min. O forno foi programado com razão de  $4 \text{ °C.min}^{-1}$  de 40 a 60 °C, de 60 a 250 °C à razão de  $8 \text{ °C.min}^{-1}$ , e por fim, de 250 a 320°C na razão de  $10 \text{ °C.min}^{-1}$ .

O processo de derivatização/silanização foi realizado na análise das amostras de ELM, ELU e ELT antes da injeção no aparelho. Para tanto, preparou-se 20 mg da amostra

adicionando-se 500  $\mu\text{L}$  de N-Methyl-N-(trimethylsilyl)trifluoroacetamide; deixou-se 15 min na estufa a 60  $^{\circ}\text{C}$ , em seguida secou-se com  $\text{N}_2$  gasoso e adicionou-se 600  $\mu\text{L}$  de hexano. Para identificação dos seus constituintes utilizou-se a biblioteca Wiley Registry<sup>TM</sup> of Mass Spectral Data, 2008.

## 2.4. Análise Térmica

As curvas de DSC foram obtidas em calorímetro TA Instruments, modelo DSC Q20, utilizando cadinhos de alumínio com cerca de  $2,0 \pm 0,1$  mg de amostra, em atmosfera de nitrogênio (fluxo de  $50 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$ ). Os experimentos foram realizados a partir da temperatura de 25  $^{\circ}\text{C}$ , resfriando-se as amostras de ELM, ELU e ELT até -70  $^{\circ}\text{C}$ , e em seguida, aquecendo-as até a temperatura de 400  $^{\circ}\text{C}$ , utilizando-se razão de aquecimento/resfriamento de  $5 \text{ }^{\circ}\text{C}\cdot\text{min}^{-1}$ . O índio (P.F. 156,6  $^{\circ}\text{C}$ ) foi utilizado como padrão para a calibração do equipamento. Os dados foram analisados usando o software TA Instruments Universal Analysis 2000, 4.7A.

As curvas termogravimétricas não-isotérmicas foram obtidas em um analisador simultâneo TG/DTA/DSC, modelo Q600 (TA Instruments), utilizando cadinhos de alumina, com cerca de  $8,0 \pm 0,1$  mg de amostra, em atmosfera de nitrogênio (fluxo de  $50 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$ ). Os experimentos foram realizados no intervalo temperatura entre 25 e 900  $^{\circ}\text{C}$ , utilizando-se razão de aquecimento de  $5 \text{ }^{\circ}\text{C}\cdot\text{min}^{-1}$ . O aparelho foi calibrado com oxalato de cálcio monohidratado e os dados foram analisados usando o software TA Instruments Universal Analysis 2000, 4.7A.

## 2.5. Avaliação da atividade antimicrobiana sobre patógenos orais

Na avaliação da atividade antimicrobiana foram utilizadas cepas padrão *American Type Culture Collection* (ATCC) de *Streptococcus parasanguinis* (903), *Streptococcus salivarius* (7073), *Streptococcus oralis* (10557) e *Streptococcus mutans* (25175) utilizando-se o método da microdiluição descrito pelo *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI, 2005); e periodontopatógenos representados por *Prevotella intermedia* (25611), *Porphyromonas gingivalis* (33277), *Fusobacterium nucleatum* (25586) e *Aggregatibacter actinomyceten comitans* (33384), utilizando-se o método de microdiluição para bactérias anaeróbias descrito pela *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI, 2008). Todos os *Streptococcus* sp

foram cultivados em caldo BHI (Brain Heart Infusion), em condições microaerófilas, em jarra de anaerobiose, a  $37 \pm 0,5$  °C por 24 horas. Os microorganismos anaeróbios foram cultivadas em TSB (Trypticase Soy Broth) contendo  $1 \text{ mg.mL}^{-1}$  de extrato de levedura,  $5 \text{ }\mu\text{g.mL}^{-1}$  de hemina e  $1 \text{ }\mu\text{g.mL}^{-1}$  de menadiona, sob condições anaeróbicas, com uma atmosfera de 90% de N<sub>2</sub>, 5% de CO<sub>2</sub>, e 5% de H<sub>2</sub>, por 48 horas, a  $37 \pm 0,5$  °C. O inóculo bacteriano para *Streptococcus* sp. foi utilizado na concentração de  $1,0 \times 10^6 \text{ UFC.mL}^{-1}$ , e para os periodontopatógenos na concentração de  $5,0 \times 10^8 \text{ UFC.mL}^{-1}$ , padronizado em espectrofotômetro no comprimento de onda de 625nm.

Em microplacas de 96 poços (TPP<sup>®</sup>), procedeu-se com a microdiluição, utilizando soluções-testes nas concentrações de 4000  $\mu\text{g}$  das amostras dos extratos liofilizados (ELM, ELU e ELT): 1 mL de solvente (100  $\mu\text{L}$  de álcool 96°: 900  $\mu\text{L}$  de água destilada), sendo realizadas oito diluições seriadas nos poços das respectivas colunas da microplaca. Os solventes foram utilizados como controle negativo e digluconato de clorexidina (Sigma Aldrich<sup>®</sup>) a 0,12% como controle positivo. Os testes foram realizados em triplicata, e as microplacas foram incubadas em anaerobiose, por 48 horas, a  $37 \pm 0,5$  °C. Após esse período, para determinação da concentração inibitória mínima (CIM) foi adicionado 20  $\mu\text{L}$  de resazurina (Sigma Aldrich<sup>®</sup>) a 0,01%, verificando-se a redução colorimétrica do corante para azul nos poços onde não houve presença de bactérias viáveis.

## 2.6. Atividade antibiofilme sobre *Fusobacterium nucleatum*

Nessa análise foi necessária a utilização de saliva, a qual seguiu o protocolo de Guggeheim et al. (2001). Para isso, estimulou-se a salivacão do pesquisador durante 2h, o qual estava em jejum há 10 h, antes da coleta higienizou-se a cavidade oral com água destilada e escova dental. Na coleta da saliva utilizou-se a seguinte proporção em tubo Falcon: 1 mL de saliva; 1 mL de tampão PBS; e 2  $\mu\text{L}$  de PMSF (Phenyl methyl sulfonyl), a fim de prevenir a ocorrência de proteólise. Em seguida, centrifugou-se durante 10 min, a 6350 rpm e 4 °C, desprezou-se o sobrenadante e, posteriormente filtrou o conteúdo resultante à vácuo pelo sistema Filtermax, com membrana PES de 0,22  $\mu\text{m}$ , a fim de manter o líquido estéril.

No ensaio do biofilme utilizaram-se cepas de *F. nucleatum* (ATCC 25585) nas mesmas condições de cultivo e concentração do inóculo, descritas no item 2.5, seguindo o protocolo de Stepaanoviet et al (2000) e Islam et al (2009) com algumas modificações.

Primeiramente 100  $\mu\text{L}$  de saliva foram pipetados em placas de 96 poços, mantendo-as à

temperatura ambiente por 2 horas. Depois desse período, o conteúdo salivar foi removido e os poços lavados uma vez com 100  $\mu\text{L}$  de tampão PBS. Em seguida adicionou-se 100  $\mu\text{L}$  de meio TSB contendo 1  $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$  de extrato de levedura, 5  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  de hemina, 1  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  de menadiona e 5% de glicose; 100  $\mu\text{L}$  das soluções das amostras de ELM, ELU e ELT a serem testadas em várias concentrações; e 100  $\mu\text{L}$  do inóculo bacteriano  $5,0 \times 10^8 \text{ UFC}\cdot\text{mL}^{-1}$ . Os testes foram feitos em triplicata e as placas mantidas a  $37 \pm 0,5 \text{ }^\circ\text{C}$  em condições de anaerobiose. Após esse período o conteúdo dos poços foi removido e estes foram lavados duas vezes com solução salina estéril, para remover as bactérias fracamente aderidas, e mantidas à temperatura ambiente para secagem. Depois de secas, adicionou-se 200  $\mu\text{L}$  de cristal de violeta a 1%, mantendo-o por 40 min, em seguida os poços foram lavados duas vezes com solução salina estéril, e mantidas à temperatura ambiente por 20 min para secagem. Em seguida, o conteúdo dos poços foi ressuspensionado com 200  $\mu\text{L}$  de álcool etílico 95° durante 40 min, logo após 150  $\mu\text{L}$  do conteúdo dos poços foi transferido para outra microplaca, na qual a densidade ótica foi mensurada através de um espectrômetro (Biotrak II Plate Reader<sup>®</sup>) com comprimento de onda de 625 nm. Os dados das absorvâncias dos poços com soluções-teste foram comparados aos poços com meio de cultura e sem inóculo e aos poços com meio de cultura + inóculo; clorexidina a 0,12% (Sigma Aldrich<sup>®</sup>) foi utilizada como controle positivo.

## 2.7. Teste de citotoxicidade em macrófagos

Os procedimentos experimentais dos testes de viabilidade celular seguiram a metodologia proposta por HOSRY *et al* (2014). Foram utilizados macrófagos imortalizados (RAW 269.7) em Meio Eagle de Dulbecco modificado - DMEM (GIBCO<sup>®</sup>, United Kingdom) acrescido de 10% de soro fetal bovino (GIBCO<sup>®</sup>) e estreptomicina (100  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ), uma vez que essas células estão relacionadas com a resposta imune do organismo no desenvolvimento das doenças periodontais.

As células foram expostas a diversas concentrações de ENM em DMEM acrescido de 1% de soro fetal bovino (GIBCO<sup>®</sup>), os testes foram feitos em sextuplicata e a microplacas foram incubadas por 48 h. Depois desse período o conteúdo dos poços foi desprezado, sendo os mesmos submetidos ao teste colorimétrico do MTT. A viabilidade mitocondrial, e conseqüentemente, a viabilidade celular, foi quantificada pela redução do MTT (um sal de coloração amarela e solúvel em água) a formazan (sal de coloração arroxeadada e insolúvel em água) pela atividade daquelas enzimas. Dessa forma, a redução do MTT a formazan, foi considerada diretamente proporcional à atividade mitocondrial e a viabilidade celular.

## 2.8. Análise Estatística

Para análise estatística, utilizou-se o software IBM SPSS Statistics version 16.0, Chicago, USA, através do qual se confeccionou um banco de dados, e as médias dos resultados obtidos nos testes de atividade antibiofilme e de viabilidade celular, foram analisadas através do ANOVA, com nível de significância de 0,05.

## 3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

---

As análises químicas por CG-EM, visualizadas nos cromatogramas da figura 1, foram obtidos pelo processo de derivatização, adicionando-se N-Methyl-N-(trimethylsilyl)-trifluoroacetamida às amostras dos extratos liofilizados obtidos pelos métodos extrativos de maceração (ELM), ultrassom (ELU) e turbólise (ELT). De acordo com a figura 1, observa-se que as amostras de ELM, ELU e ELT possuem o mesmo perfil cromatográfico, e os mesmos constituintes químicos, em tempos de retenções similares, mas apresentam diferenças quantitativas. Nesse âmbito ressalta-se que o método de extração por turbólise foi o que extraiu a menor proporção de fitoconstituintes.

Atualmente, a produção de derivados do trimetilsilil tem se destacado como uma das técnicas de derivatização mais utilizadas em análises cromatográficas. Nesse processo ocorre a substituição de hidrogênios lábeis de um grupo funcional polar (-OH, -COOH, NH e SH) pelo grupo trimetilsilil (TMS). Dessa forma, as classes químicas (álcoois, ácidos carboxílicos, fenóis, carboidratos e esteróides) que apresentam esses grupos funcionais, podem ser derivatizadas pela trimetilsililação e os constituintes dos extratos podem ser diretamente analisados por CG-EM, tornando as medidas quantitativas desses compostos mais seguras (FARAJZADEH, NOURI, KHORRAM, 2014; WANG et al., 2009).

Figura 1: Cromatogramas obtidos a partir de CG-EM das amostras de ELU (vermelho), ELT (azul) e ELM (preto). Eixo horizontal: tempo de retenção  $T_R$  (em minutos); Eixo vertical: abundância relativa dos constituintes nas amostras. A:  $T_R$ :0-65; B:  $T_R$ :0-20; C:  $T_R$ :20-30; D:  $T_R$ :30-45

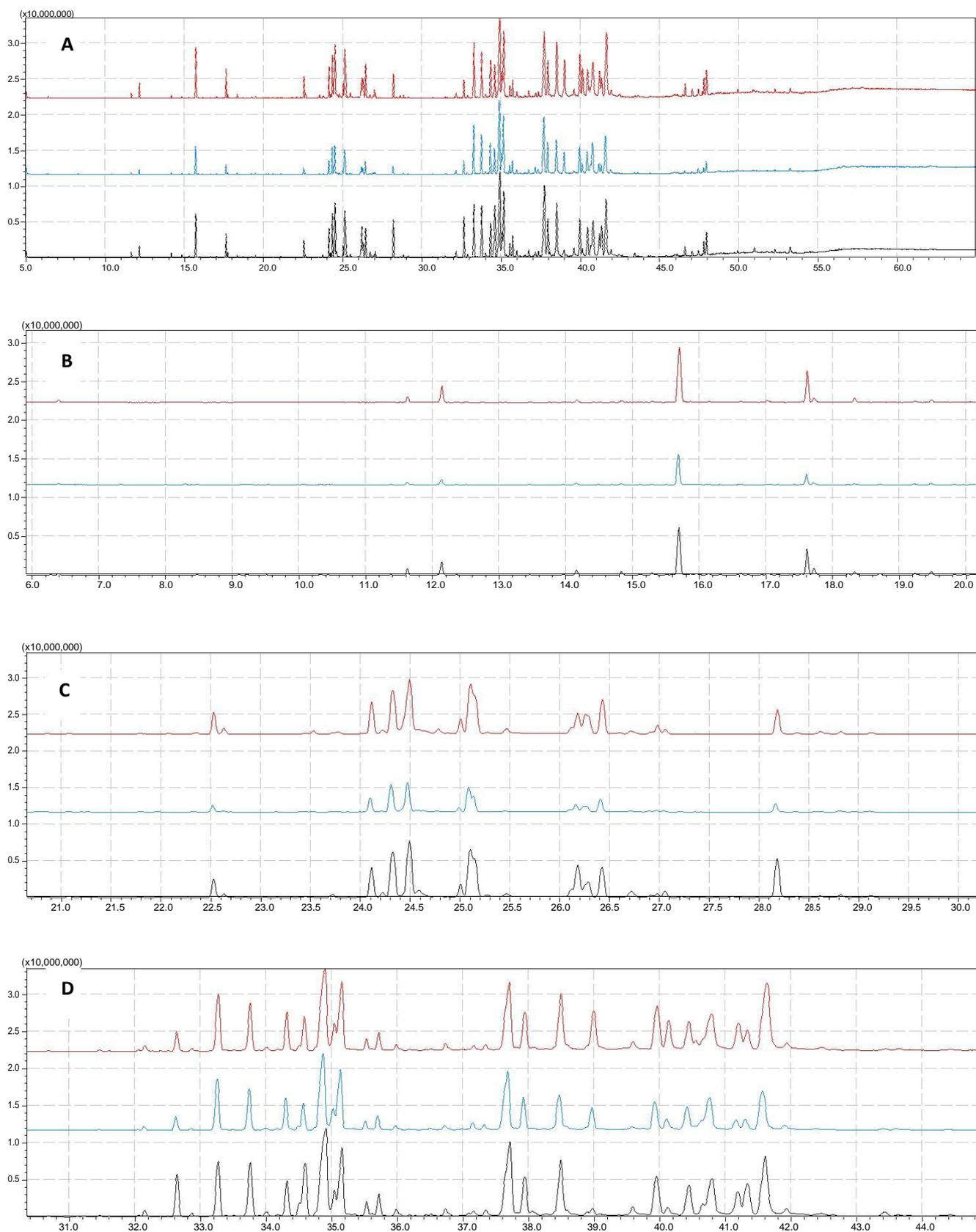


Tabela 1: Constituintes dos extratos liofilizados de *C. blanchetianus* Baill obtidos por maceração (M), ultrassom (U) e turbólise (T) identificados por CG-MS.

	Constituintes	<sup>a</sup> T <sub>R</sub> (M)	<sup>b</sup> %(M)	T <sub>R</sub> (U)	% (U)	T <sub>R</sub> (T)	% (T)	<sup>c</sup> Wiley Registry (%)
<i>Sesqui-terpenos</i>	$\alpha$ -copaene	14,16	0,22	14,15	0,11	14,15	0,02	94
	(E)-Cariofileno	15,29	0,10	15,29	0,04	-	-	93
	$\gamma$ -Cadineno	17,72	0,33	17,72	0,19	17,71	0,12	93
<i>Polióis</i>	Xilitol	22,52	0,78	22,53	0,94	22,51	0,44	93
	Ribitol	22,63	0,13	22,63	0,21	22,62	0,05	93
	D-glucitol	26,91	0,05	26,98	0,40	-	-	92
<i>Monossacarídeos</i>	Glicofuranose	24,11	1,37	24,11	1,46	24,09	0,95	90
	D-frutose	24,49	2,98	24,49	3,33	24,47	2,28	90
	D-glicose	25,00	0,52	25,01	0,61	24,98	0,27	94
	Hexopiranosose	28,18	2,08	28,18	1,22	28,16	1,07	95
	Metil- $\beta$ -D-galactofuranose	26,18	2,11	26,18	1,35	26,16	0,81	95
	Kaur-16-eno	28,18	2,08	28,19	1,22	28,16	0,56	90
	Ácido hexadecanóico	28,81	0,13	28,82	0,1	28,80	0,11	90
	Metil- $\alpha$ -D-glicopiranosose	41,33	3,04	41,33	1,60	41,3	1,25	95
	Sacarose	41,60	6,25	41,63	8,21	41,56	6,75	90
	Epicatequina	46,60	0,51	46,61	0,72	46,58	0,21	94

(<sup>a</sup>): Tempo de Retenção (em minutos); (<sup>b</sup>): Porcentagem da área total integrada para o cromatograma; (<sup>c</sup>): Percentagem de similaridade na biblioteca Wiley Registry, 2008.

A tabela 1 mostra os constituintes que foram identificados nos extratos liofilizados de *C. blanchetianus*, na qual nota-se uma grande concentração de açúcares em todas as amostras testadas, destacando-se a maior proporção nos extratos obtidos por ultrassom (ELU). Nas amostras de ELU a sacarose, com 8,21%, e a D-frutose, com 3,33%, foram os componentes mais concentrados. Essa grande quantidade de açúcares pode ser justificada pelo fato da análise ser realizada em extratos etanólicos brutos liofilizados, que trazem em sua constituição uma grande densidade de carboidratos originários da fotossíntese dos vegetais. Nesse aspecto,

podemos concluir que no método ultrassônico é possível extrair uma maior quantidade de açúcares em relação aos demais métodos testados, o que pode influenciar nos resultados de testes biológicos que possuam princípios-ativos derivados de carboidratos. Nenhum estudo, até então, tinha avaliado essas diferenças químicas quantitativas e qualitativas para os métodos extrativos.

Verificamos que óleos essenciais também estão presentes nas amostras, mesmo não sendo processos extrativos adequados para a obtenção desses compostos, é possível que o contato do solvente etanólico com o material vegetal possa extrair algum componente volátil, o que é representado pela baixa concentração desses constituintes. Nota-se que sua participação no volume total de constituintes é inferior a 0,5% em todas as amostras, e que, provavelmente apenas os óleos essenciais com maior peso molecular, como os sesquiterpenos apresentados na tabela 18, conseguem resistir às variações térmicas inerentes a esses métodos extrativos. Neste âmbito, nota-se que nas amostras de ELM há uma maior proporção desses constituintes, quando comparado às amostras de ELT, o que é compreensível pelo fato da turbólise aquecer as amostras durante a dispersão térmica ocasionada pela energia cinética das forças de cisalhamento, em consequência da elevada velocidade de agitação, o que determinaria a perda de compostos voláteis.

Como não foram utilizados padrões internos, a identificação de alguns compostos não foi possível. Constituintes químicos presentes em grandes concentrações, evidenciadas por picos relevantes no intervalo de 30 a 40 min (figura 1), não foram identificados, apresentaram detecções imprecisas na espectrometria de massas, relacionadas ao baixo grau de resolução desses picos. Dessa forma, alguns compostos permaneceram não-identificados, sendo necessário que mais estudos sejam feitos para elucidar a constituição química dessas substâncias.

Em seguida foram realizados estudos de análise térmica para os extratos liofilizados, utilizando TG e DSC, observados nas figuras 2 e 3 e nas tabelas 2 e 3. Nota-se que há uma maior quantidade de etapas de decomposição, e um maior teor de resíduos (17,26%), nas amostras de ELU. Esses dados são substanciados pelas conclusões da análise cromatográfica que apontam uma maior quantidade de compostos extraídos pelo método ultrassônico, o que acarreta maior complexidade térmica, pois os processos endotérmicos de decomposição ocorrem em sequência, formando diversos picos de energia sobrepostos e com pouca resolução, como aponta a curva DSC do ELU.

Figura 2: Curvas TG e DSC dos extratos ELU, ELM e ELT obtidos por diferentes métodos de extração. A: Curvas TG e DSC para ELM; B: Curvas TG e DSC para ELT; C: Curvas TG e DSC para ELU.

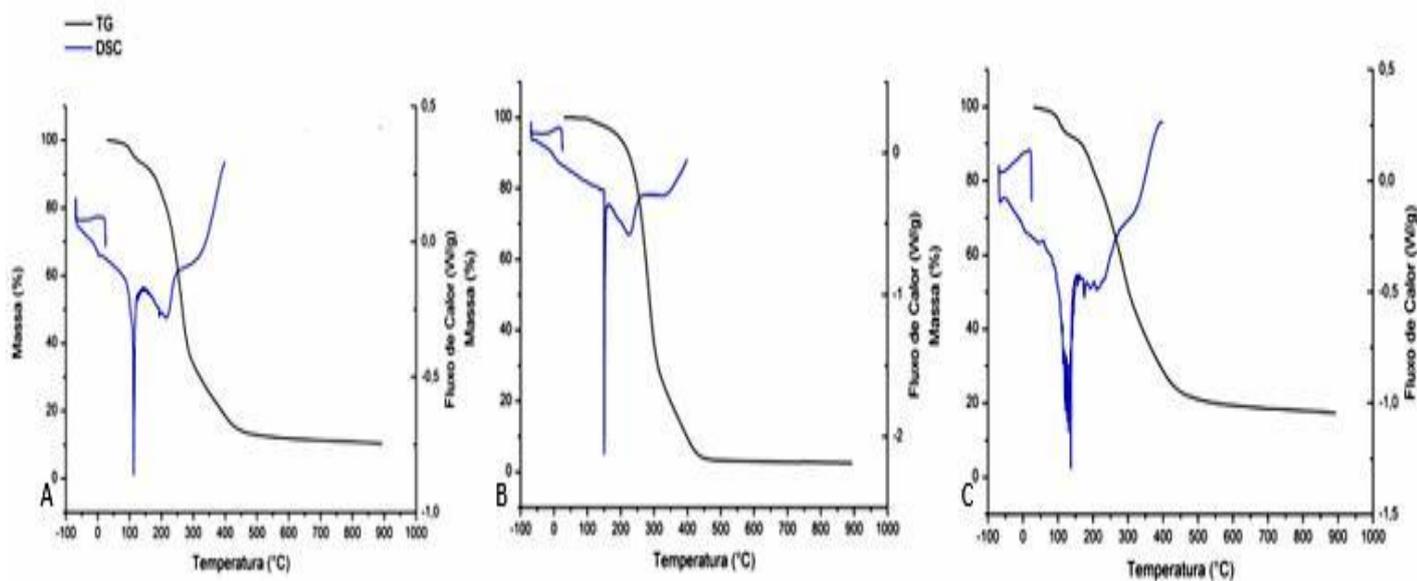


Figura 3: Curvas TG e DSC dos extratos ELU, ELM e ELT. A: Sobreposição das curvas DSC dos extratos ELM, ELU e ELT; B: Sobreposição das curvas TG dos extratos ELM, ELU e ELT.

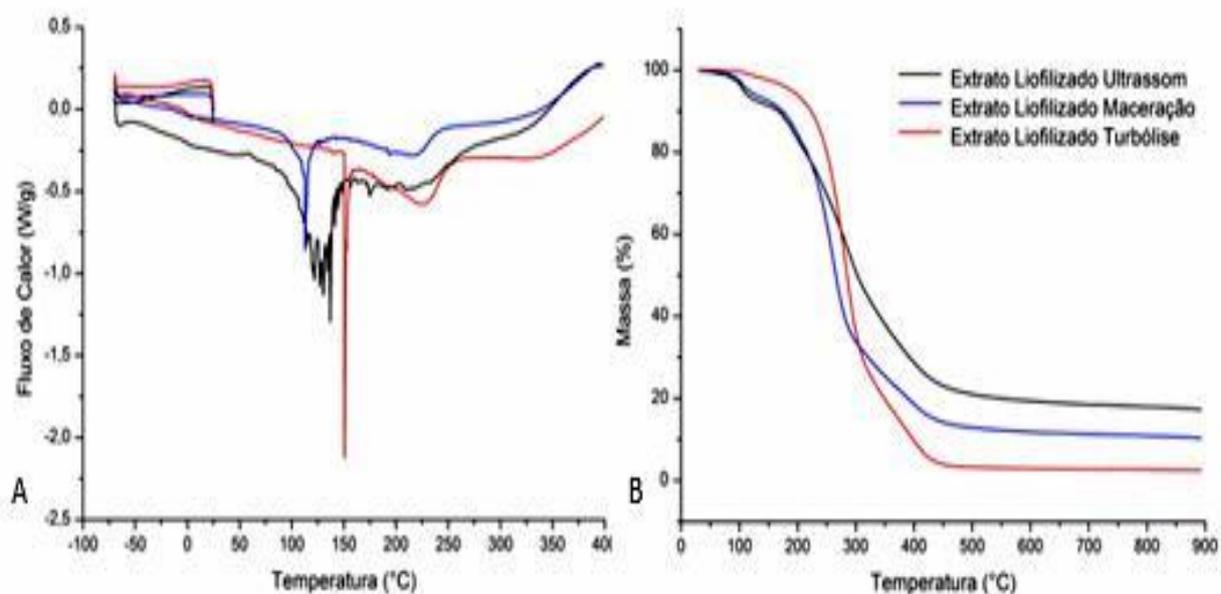


Tabela 2: Dados de calorimetria diferencial exploratória (DSC) referentes aos processos de transições endotérmicos e exotérmicos, observados nas amostras de ELU, ELM e ELT.

Amostras	Etapas	T <sub>i</sub>	T <sub>p</sub>	T <sub>f</sub>	ΔE
ELM	1	85,79	112,72	139,95	57,27
	2	139,95	219,04	261,17	94,06
ELU	1	59,15	136,91	151,05	251,5
	2	172,00	174,73	181,30	3,74
ELT	1	149,90	150,35	163,30	33,55
	2	163,32	226,14	268,71	142,3

T<sub>i</sub>: Temperatura Inicial(°C); T<sub>p</sub>: Temperatura de Pico(°C); T<sub>f</sub>: Temperatura Final(°C); ΔE:Variação de energia na etapa, em J. g<sup>-1</sup>.

Tabela 3: Dados de Termogravimetria (TG) referentes às etapas de decomposição nas amostras ELM, ELU e ELT.

Amostras	Etapas	T <sub>i</sub>	T <sub>f</sub>	<sup>a</sup> Perda	<sup>a</sup> Resíduo
ELM	1	30,02	134,64	6,51	
	2	134,64	296,29	58,81	
	3	296,29	489,13	21,6	10,28
ELU	1	30,02	126,14	7,18	
	2	126,14	206,49	11,45	
	3	206,49	319,92	36,43	
ELT	4	319,92	530,7	24,66	17,26
	1	98,72	315,20	71,21	
	2	315,20	471,17	25,02	2,48

T<sub>i</sub>: Temperatura Inicial (em °C); T<sub>f</sub>: temperatura Final (em °C);

(<sup>a</sup>): Dados expressos em percentagem.

A amostra de ELT apresentaram apenas duas etapas de decomposição e ao final do processo obteve-se menor teor de resíduos, como se visualiza na figura 2 e na tabela 3,

entretanto o processo de decomposição inicia-se apenas a 98,72 °C, enquanto que as amostras de ELM e ELU iniciam essa etapa desde a temperatura inicial do forno a 30 °C. Desses eventos conjectura-se que esse extrato pode apresentar uma maior estabilidade térmica, iniciando seu processo de degradação em temperaturas mais elevadas, como também pode estar relacionado às conclusões da análise de CG-EM, que apontam uma menor proporção de fitoconstituintes nessa amostra o que resultaria em uma menor quantidade de resíduos.

Através da constituição química identificada por CG-EM, podemos traçar o perfil térmico das substâncias dos extratos liofilizados pelas análises DSC e TG. Pode-se inferir através da identificação dos Pontos de Fusão (PF) e de Ebulição (PE) no Merck Index (2013) que os vários picos endotérmicos sobrepostos coincidem com processos de decomposição na faixa de 296 °C - 489,13 °C, para ELM, de 319,92 °C - 530,7 °C, para ELU e de 315,20 °C - 471,17 °C para ELT. Esses eventos podem estar veiculados a degradação de açúcares presentes nas amostras, como glicofuranose (PE 476,9 °C), Metil-β-D-galactofuranose (PE 444,8 °C), e de terpenos como o kaur-16-eno (PE 346,94 °C).

Para a avaliação da atividade antimicrobiana, conforme observado na tabela 4, houve uma triagem sobre *Streptococcus* sp para avaliar o potencial do *C. blanchetianus* Baill no controle de bactérias colonizadoras do biofilme; e em seguida, realizaram-se os testes sobre periodontopatógenos. Na triagem sobre estreptococos orais, todos os extratos inibiram as cepas de *Streptococcus* sp., entretanto quando analisamos os dados do *S. mutans* notamos que enquanto os extratos de maceração e turbólise produziram inibição bacteriana a 125 µg/mL, os extratos obtidos por ultrassom apresentaram CIM de 62,5 µg/mL. O xilitol, um dos polióis identificados nas amostras da planta por CG-EM, pode estar envolvido nessa ação antibacteriana sobre os estreptococos, especialmente o *S. mutans*. Estudos indicam que esse composto neutraliza a redução do pH na cavidade oral induzida pelo patógeno; além disso o xilitol consegue penetrar na célula bacteriana e através do sistema fototransferase de frutose (PTS) ser metabolizado para xilitol-5-fosfato, o qual torna-se tóxico à bactéria (BAHADOR, LESAN, KASHI, 2012).

Na análise dos extratos liofilizados, todos os periodontopatógenos foram inibidos pelos extratos da planta, com relevância para os anaeróbios restritos. *P. gingivalis*, *P. intermedia* e *F. nucleatum* apresentaram CIMs de 15,6 µg.mL<sup>-1</sup>, enquanto que o anaeróbio facultativo *A. actinomycetencomitans* foi sensível à concentração de 31 µg.mL<sup>-1</sup>. A epicatequina, pertencente à classe dos taninos, presente em todas as amostras de extratos liofilizados, pode estar relacionada com essa ação antibacteriana.

Tabela 4: Concentrações inibitórias mínimas (CIMs), em ( $\mu\text{g.mL}^{-1}$ ), dos extratos liofilizados da casca de *C. blanchetianus*, obtidos por diferentes métodos extrativos, na triagem sobre *Streptococcus* sp e frente à periodontopatógenos.

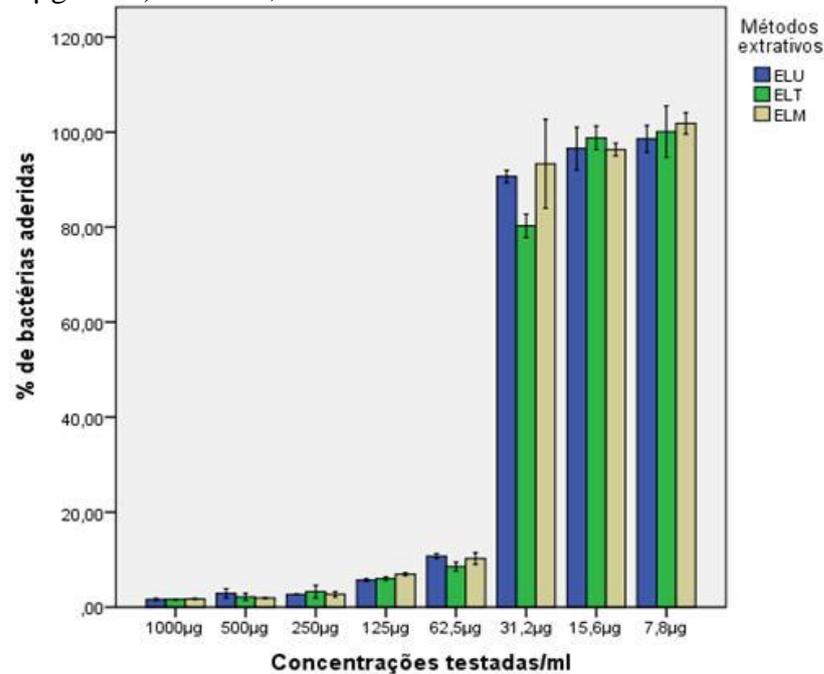
Extratos Liofilizados	CIM ( $\mu\text{g.mL}^{-1}$ )			
	<i>S. mutans</i> ATCC 25175	<i>S. oralis</i> ATCC 10557	<i>S. parasanguinis</i> ATCC 903	<i>S. salivarius</i> ATCC 7073
Métodos de Extração				
Ultrassom	62,5	62,5	62,5	125
Turbólise	125	62,5	62,5	125
Maceração	125	62,5	62,5	125
Métodos de Extração				
	<i>P. gingivalis</i> ATCC 33277	<i>P. intermedia</i> ATCC 25611	<i>A. actinomycetencomitans</i> ATCC 33384	<i>F. nucleatum</i> ATCC 25586
Ultrassom	15,6	15,6	31,2	15,6
Turbólise	15,6	15,6	31,2	15,6
Maceração	15,6	15,6	31,2	15,6

Segundo alguns autores a epicatequina reduz a quantidade de espécies reativas de oxigênio (ROS), que são mediadores inflamatórios de diversas desordens patológicas incluindo a doença periodontal. Essa substância que possui atividade antioxidante confirmada apresentaria, então forte ação sobre anaeróbios restritos, mas teria seu espectro reduzido sobre o *A. actinomycetencomitans*. Estudos clínicos apontam que quando catequinas são utilizadas em formulações farmacêuticas adjuvantes à terapia periodontal convencional, ocorre uma melhora significativa nos sinais clínicos e na redução da quantidade de periodontopatógenos como *P. gingivalis* e *P. intermedia* no interior da bolsa periodontal (HO et al., 2001; KUDVA, TABASUM, SHEKHAWAT, 2011).

A figura 4, que apresenta as médias e desvio-padrão da porcentagem de bactérias que permaneceram aderidas às placas de poliestireno, no teste do potencial antibiofilme dos extratos liofilizados de *C. blanchetianus*, sugere que as amostras testadas têm um excelente potencial antiaderente sobre *F. nucleatum*. Dessa forma os extratos ELM, ELT e ELU quando utilizados entre as concentrações de  $1000 \mu\text{g.mL}^{-1}$  e  $62,5 \mu\text{g.mL}^{-1}$  conseguiram inibir a aderência desse patógeno e, portanto, podem interferir no mecanismo de formação do biofilme subgingival, patológico aos tecidos periodontais. Diterpenos, como o kaur-16-eno, presentes nas amostras avaliadas, já foram relatados em outros estudos, através dos quais, quando esses compostos são

isolados de plantas medicinais conseguem produzir inibição de cepas de *F. nucleatum* em concentrações que variam de 1 a 10  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  (CARVALHO et al, 2011).

Figura 4: Percentagem de *F. nucleatum*, aderidos após 24 h de tratamento com diversas concentrações (em  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ) de ELM, ELU e ELT.



A análise estatística, apresentada na tabela 5, foi realizada para comparar qual das amostras seria a mais efetiva na inibição da aderência bacteriana *in vitro*, para isso foi realizado o teste ANOVA, com pós-teste Tukey, a fim de comparar as médias das percentagens de *F. nucleatum* aderidas após a aplicação dos extratos liofilizados (ELU, ELM e ELT) em diversas concentrações. Os resultados apontam que não houve diferença estatisticamente significativa ( $p > 0,05$ ) quando se comparou os extratos entre si, entretanto nota-se que todos os extratos foram capazes de reduzir a aderência bacteriana.

Na concentração de 1000  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , todos os extratos inibiram a adesão das fusobactérias, nas amostras de ELU observou-se que apenas  $1,59\% \pm 0,27$  das bactérias permaneceram aderidas, no ELT foi  $1,63\% \pm 0,10$  e no ELM apenas  $1,73\% \pm 0,13$ , sem diferença estatisticamente significativa entre as amostras ( $p > 0,05$ ). Essa porcentagem aumentou para  $90,66\% \pm 1,31$  (ELU),  $80,27\% \pm 2,47$  (ELT) e  $93,32\% \pm 9,36$  (ELM) quando concentrações de  $31,2 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ . Portanto quando utilizadas nas concentrações entre 1000  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  e  $62,3 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  todos os extratos inibiram a adesão de *F. nucleatum* apresentando potencial atividade antibiofilme.

Tabela 5: Relação das médias das porcentagens de *F. nucleatum* aderidas, entre as diversas concentrações (em µg/ml) testadas das amostras de ELU, ELM e ELT .

Concentrações				
Testadas	%U	%T	%M	* <i>p</i> -valor
1000	1,59±0,27	1,63±0,10	1,73±0,13	
	<i>p</i> (T-U)			0,963
	<i>p</i> (U-M)			0,660
	<i>p</i> (T-M)			0,806
500	2,87±1,00	2,10±0,74	1,92±0,42	
	<i>p</i> (T-U)			0,486
	<i>p</i> (U-M)			0,514
	<i>p</i> (T-M)			0,923
250	2,86±0,75	3,26±1,33	2,71±0,55	
	<i>p</i> (T-U)			0,693
	<i>p</i> (U-M)			0,999
	<i>p</i> (T-M)			0,717
125	5,99±0,39	5,69±0,20	6,93±0,33	
	<i>p</i> (T-U)			0,233
	<i>p</i> (U-M)			0,051
	<i>p</i> (T-M)			0,030
62,5	10,75±5,04	8,56±0,92	10,23±1,24	
	<i>p</i> (T-U)			0,066
	<i>p</i> (U-M)			0,784
	<i>p</i> (T-M)			0,155
31,2	90,66±1,31	80,27±2,47	93,32±9,36	
	<i>p</i> (T-U)			0,140
	<i>p</i> (U-M)			0,836
	<i>p</i> (T-M)			0,067
15,6	96,53±4,47	98,74±2,50	96,31±1,55	
	<i>p</i> (T-U)			0,659
	<i>p</i> (U-M)			0,996
	<i>p</i> (T-M)			0,609
7,8	98,57±2,84	102,09±5,41	101,81±2,27	
	<i>p</i> (T-U)			0,877
	<i>p</i> (U-M)			0,514
	<i>p</i> (T-M)			0,845

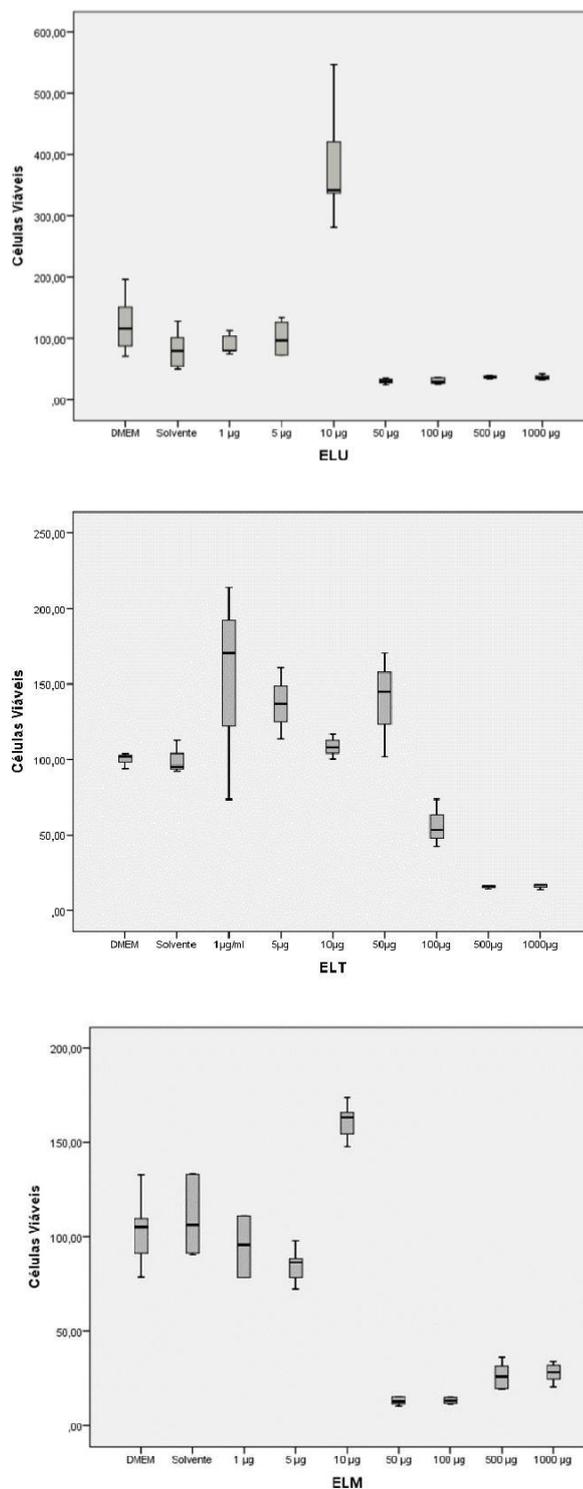
(\*): valores obtidos pelo ANOVA, pós-teste Tukey, com valor de significância de 0.05.

Em estudo que avaliou a atividade antimicrobiana de um total de 32 extratos hexânicos e etanólicos de crotonóides como *C. sellowii*, *C. rhamnifolius*, *C. jacobinensis* e *C. micans*, pelo método de difusão em ágar, sobre *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli*, os autores observaram a formação de pequenos halos de inibição (RAMOS et al., 2009). Apesar de alguns estudos de atividade antimicrobiana terem sido realizados com extratos de plantas do gênero *Croton*, nenhum estudo tinha avaliado a influência dos fatores extrativos nessa atividade biológica, e espécies de *C. blanchetianus* Baill nunca tinham sido avaliadas sobre bactérias anaeróbias, tendo em vista seu potencial na periodontia.

Além do aspecto antimicrobiano, conclusões relevantes às amostras avaliadas podem ser mencionadas. Algumas análises mostram que alditóis (ribitol, xilitol e d-glucitol) e monossacarídeos (glicopirranose, frutose, galactopirranose e ribose), presentes em todos os extratos liofilizados, são capazes de inibir a ação da cicloxigenase (COX-1) e a síntese de tramboxanos (TXA2), enzimas que estão diretamente relacionadas com a resposta inflamatória decorrente da periodontite. Em estudo que avaliou esse potencial, diterpenóides isolados de *Croton tonkinensis* (crotonkinensis A eB) inibiram a expressão de COX-2 em macrófagos RAW 264.7 (FINE et al., 2009; THUONG et al., 2009; LI, YU, FAN, 2014).

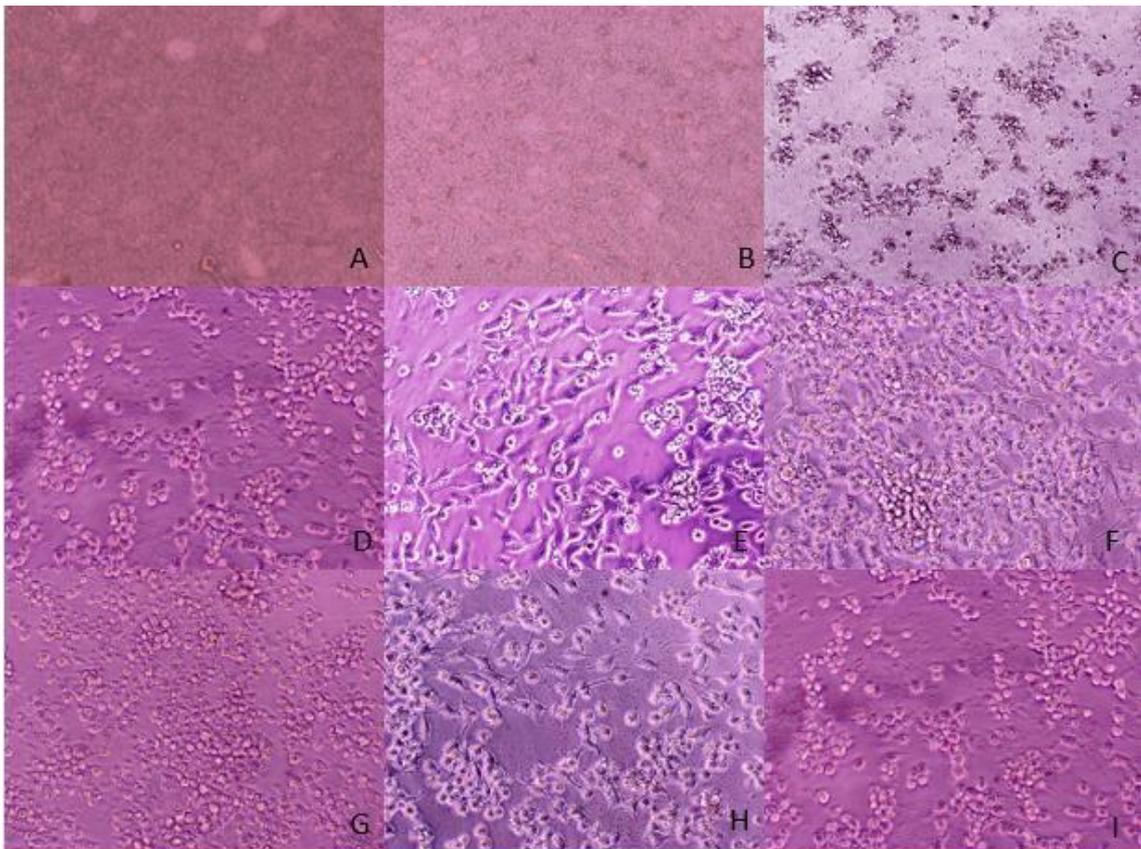
Os resultados do teste de viabilidade celular com macrófagos (figura 5) apontam que as amostras de ELU foram tóxicas entre 50 e 1000  $\mu\text{g/mL}$ , permitindo a viabilidade de apenas  $11,08\% \pm 4,4$  das células, na maior concentração, e de  $20,07\% \pm 6,08$  a  $50 \mu\text{g.mL}^{-1}$ ; ELM também foi tóxico nesse intervalo de concentrações, a 1000  $\mu\text{g/mL}$  reduziram a viabilidade celular para  $22,20\% \pm 9,56$  e a  $50 \mu\text{g.mL}^{-1}$  para  $17,46\% \pm 3,88$ . Entretanto os extratos de ELT foram menos tóxicos e induziram a redução da viabilidade celular entre 500-1000  $\mu\text{g.mL}^{-1}$  e a  $100 \mu\text{g.mL}^{-1}$ , pelo menos  $51,80\% \pm 20,01$  das células permaneceram viáveis. Essas diferenças, apontando uma menor toxicidade para as amostras de ELT, podem ser decorrentes da menor proporção de fitoconstituintes que esse método consegue extrair. De acordo com a tabela 18 todos os componentes das amostras de ELT estão em menor proporção quando comparados aos extratos de ELU e ELM, conseqüentemente, apresentando uma menor quantidade de bioativos seus efeitos tóxicos podem ser minimizados.

Figura 5: *Box-plot* apresentando a citotoxicidade *in vitro*, relacionando as porcentagens de macrófagos RAW 264.7 viáveis, após 48 h de tratamento com diferentes concentrações de ELM, ELT e ELU.



A figura 5 também aponta que as amostras de ELU e ELM aumentaram o número de células viáveis na concentração de  $10 \mu\text{g.mL}^{-1}$ , quando comparadas aos controles positivos com DMEM; o ELT também obteve esse efeito quando as concentrações variaram entre  $1 - 50 \mu\text{g.mL}^{-1}$ . Esse efeito pode ser visualizado na figura 6, e pode está vinculado ao fato de alditóis, como o ribitol, apresentarem ação antioxidante, diminuindo o estresse oxidativo responsável pela morte celular, e, conseqüentemente aumentando o número de células viáveis, observadas no teste de coloração com o MTT (STONE et al., 2014).

Figura 6: Fotomicrografias das culturas de macrófagos RAW 269.7, após 48 h de tratamento com diferentes concentrações do ELU de *C. blanchetianus* Baill, feitas em microscópio invertido de fase (Nikon Eclipse TS 100), 100x; A:  $1000 \mu\text{g.mL}^{-1}$ ; B:  $500 \mu\text{g.mL}^{-1}$ ; C:  $100 \mu\text{g.mL}^{-1}$ ; D:  $50 \mu\text{g.mL}^{-1}$ ; E:  $10 \mu\text{g.mL}^{-1}$ ; F:  $5 \mu\text{g.mL}^{-1}$ ; G:  $1 \mu\text{g.mL}^{-1}$ ; H: DMEM; I: Solvente (DMEM + álcool 20%).



Muitos testes biológicos, como os de citotoxicidade, necessitam mensurar a sobrevivência e/ou proliferação celular, os quais podem ser realizados por vários métodos, entre eles, a contagem de células que inclui/exclui um corante, avaliação da proteína Cromo (51Cr) depois da lise celular e avaliação da incorporação de nucleotídeos radioativos (3H timidina) durante a proliferação celular. O sal de tetrazólio ou MTT (brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-

il)-2-5 difeniltetrazólio), que foi utilizado neste estudo, pode ser empregado como um importante método quantitativo colorimétrico para avaliação da sobrevivência e da proliferação de células. Esse método detecta o sinal gerado pela ativação de células vivas, cuja avaliação é realizada por um espectrofotômetro, equipamento também chamado de leitor de Elisa, que apresenta um alto grau de precisão na leitura de incrementos celulares para o estudo de citotoxicidade (MELO, DURÁN, HAUN, 2002; HAUN, SOUZA-BRITO, 2003).

Os testes de citotoxicidade *in vitro* são úteis para avaliação dos efeitos biológicos de materiais odontológicos, ou de fitoterápicos que têm perspectivas de uso na odontologia, porém, apresentam limitações como a dificuldade de comparar os resultados encontrados nesses testes com a realidade das situações clínicas. Por outro lado, interpretações comparativas dos dados de toxicidade *in vitro* fornecem informações valiosas em relação ao potencial tóxico de substâncias presentes na planta, determinadas pela análise química (PERROT et al., 2003).

#### 4. CONCLUSÕES

---

- Através de CG-EM, identificou-se que os extratos liofilizados por maceração (ELM), ultrassom (ELU) e turbólise (ELT) possuem os mesmos fitoconstituintes, com grande quantidade de monossacarídeos, mas no ELT a proporção de todos os compostos é menor;
- Os testes termoanalíticos mostraram que as amostras de ELT iniciaram o processo de decomposição em temperaturas superiores às demais amostras testadas, apresentando, por isso, maior estabilidade térmica.
- Na atividade antibiofilme sobre *Fusobacterium nucleatum* mostrou-se que não há diferença estatisticamente significativa ( $p > 0,05$ ) quando se comparou os extratos entre si, entretanto nota-se que todos os extratos foram capazes de reduzir a aderência bacteriana.
- O extrato obtido por turbólise foi o único, que na concentração de  $50 \mu\text{g.mL}^{-1}$ , não induziu efeitos citotóxicos nas linhagens de macrófagos testadas, podendo ser considerado o menos citotóxico.

## REFERÊNCIAS

---

- Arceusz A, Wesolowski M, Konieczynski P. Methods for extraction and determination of phenolic acids in medicinal plants: a review. *Nat Prod Commun* 2013; 8 (12): 1821-9.
- Bahador A, Lesan S, Kashi N. Effect of xylitol on cariogenic and beneficial oral streptococci: a randomized, double-blind crossover trial. *Iran J Microbiol* 2012; 4(2): 75-81.
- Brasil. Ministério da Saúde. Secretaria Executiva. Secretaria de Atenção à Saúde. Política Nacional de Práticas Integrativas e Complementares no SUS (PNPIC). Brasília, 2008. 49p.
- Brasil. Ministério da Saúde. Secretaria de Atenção à Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. SB Brasil 2010: Pesquisa Nacional de Saúde Bucal: resultados principais / Ministério da Saúde. Secretaria de Atenção à Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. – Brasília: Ministério da Saúde, 2012.
- Carvalho TC, Simão MR, Ambrósio SR, Furtado NA, Veneziani RC, Heleno VC, Da Costa FB, Gomes BP, Souza MG, Borges dos Reis E, Martins CH. Antimicrobial activity of diterpenes from *Viguiera arenaria* against endodontic bacteria. *Molecules* 2011; 16(1): 543-51.
- CLSI. *Clinical and Laboratory Standards Institute*. Metodologia dos Testes de Sensibilidade a Agentes Antimicrobianos por Diluição para Bactéria de Crescimento Aeróbico, 2005.
- CLSI. *Clinical and Laboratory Standards Institute*. Metodologia dos Testes de Sensibilidade a Agentes Antimicrobianos por Diluição para Bactéria de Crescimento Anaeróbico, 2008.
- Farajzadeh MA, Nouri N, Khorram. Derivatization and microextraction methods for determination of organic compounds by gas chromatography. *TrCA Trends in Analytical Chemistry* 2012; 55: 14-23.
- Fine DH, Markowitz K, Furgang D, Fairlie K, Ferrandiz J, et al. Macrophage inflammatory protein 1-a: a salivary biomarker of bone loss in a longitudinal cohort study of children at risk for aggressive periodontal disease? *J Periodontol* 2009; 80: 106–113.
- Guggenheim B, Giertsen W, Schupbach P, Shapiro S. Validation of an in vitro biofilm model of supragingival plaque. *J Dent Res* 2001; 80(1):363–70.
- Hosry L, Giorgio C, Birer C, Tueni M, Bun SS, Herbette G, Meo M, Ollivier O, Elias R. In vitro cytotoxic and anticlastogenic activities of saxifragifolin B and cyclamin isolated from *Cyclamen persicum* and *Cyclamen libanoticum*. *Pharm Bio* 2014; Epub Mar 20.

- Islam B, Khan SN, Naeem A, Sharma V, Khan AU. Novel effect of plant lectins on the inhibition of *Streptococcus mutans* biofilm formation on saliva-coated surface. *J Appl Microbiol* 2009; 106: 1682–1689.
- Li J, Yu G, Fan J. Alditols and monosaccharides from sorghum vinegar can attenuate platelet aggregation by inhibiting cyclooxygenase-1 and thromboxane-A<sub>2</sub> synthase. *J Ethnopharmacol* 2014; S0378-8741(14)00387-0.
- Melo PS, Durán N, Haun M. Derivatives of dehydrocrotonin, a diterpene lactone isolated from *Croton cajucara*: cytotoxicity in rat cultured hepatocytes and in V79 cells. *Hum Exp Toxicol* 2002; 21(5): 281-288.
- Nardi GM, Dalbo S, Monache FD, Pizzolatti MG, Ribeiro-Do-Valle RM. Antinociceptive effect of *Croton celtidifolius* Baill (Euphorbiaceae). *J Ethnopharmacol* 2006; 107: 73-78.
- Pasich E, Walczewska M, Pasich A, Marcinkiewicz J. Mechanism and risk factors of oral biofilm formation *Postepy Hig Med Dosw* 2013; 67: 736-41
- Paterniti I, Briguglio E, Mazzon E, Galuppo M, Oteri G, Cordasco G, Cuzzocrea S. Effects of *Hypericum Perforatum*, in a rodent model of periodontitis. *BMC Complement Altern Med* 2010; 23(10): 70-73.
- Pereira SLS, Oliveira JW, Angelo KK, Costa AM, Costa F. Clinical effect of a mouth rinse containing *Ocimum gratissimum* on plaque and gingivitis control. *The Journal of Contemporary Dental Practice* 2011; 12(5): 350-355.
- Pereira EM, Gomes RT, Freire NR, Aguiar EG, Brandão Md, Santos VR. In vitro antimicrobial activity of Brazilian medicinal plant extracts against pathogenic microorganisms of interest to dentistry. *Planta Med* 2011; 77 (4): 401-404.
- Perrot S, Dutertre-Catella H, Martin C, Rat P, Warnet JM. Resazurin metabolism assay is a new sensitive alternative test in isolated pig cornea. *Toxicol Sciences* 2003; 72: 122-9.
- Ramos SCS, Oliveira JCS, Camara CAG, Castelar I, Carvalho nAFFU, Lima JV. Antibacterial and cytotoxic properties of some plant crude extracts used in Northeastern folk medicine. *Braz J Pharmacog* 2009; 19: 376-381.
- Socransky SS, Smith C, Haffajee AD: Subgingival microbial profiles in refractory periodontal disease. *J Clin Periodontol* 2002; 29:260.
- Stepanovic S, Vukovic D, Dakic I, Savic B, Svabic-Vlahovic M. A modified microtiterplate test for quantification of staphylococcal biofilm formation. *J Microbiol Methods* 2000; 40(2): 175–9.

Stone V, Kudo KY, August PM, Marcelino TB, Matté C. Polyols accumulated in ribose-5-phosphate isomerase deficiency increase mitochondrial superoxide production and improve antioxidant defenses in rats' prefrontal cortex. *Int J Dev Neurosci.* 2014; 37C: 21-25. Thuong PT, Dao TT, Pham TH, Nguyen PH, Le TV, Lee KY, Oh WK. Crotonkinensins A and B, diterpenoids from the Vietnamese medicinal plant *Croton tonkinensis*. *J Nat Prod.* 2009; 72 (11): 2040-2042.

Wang X, Luo L, Lin L, Nova F, Luan T. One-step extraction and derivatization liquid-phase microextraction for the determination of chlorophenols by gas chromatography – mass spectrometry. *J Chromatography A* 2009; 1216: 28-35.

World Health Organization (WHO). *General Guidelines for Methodologies on Research and Evaluation of Traditional Medicine.* Geneva, 2000.

## CAPÍTULO IV

---

SOUZA, Emmanuel Albuquerque de. **Composição química e efeito biológico de óleos essenciais de *Croton blanchetianus* Baill. sobre bactérias do biofilme oral e na viabilidade celular de macrófagos RAW 269.7.** Campina Grande-PB: UEPB, 2014. 160p.(Dissertação – Mestrado em Odontologia).

### RESUMO

Óleos essenciais (OEs) têm a capacidade de reduzir o biofilme dental pré-formado, retardar o seu desenvolvimento e, conseqüentemente, das doenças periodontais. A composição química e os efeitos biológicos de óleos essenciais da casca (OEC) e da folha (OEF) de *Croton blanchetianus* Baill foram avaliados nesse trabalho. A composição química foi determinada por Cromatografia Gasosa acoplada a Espectrometria de Massas (CG-EM) e o comportamento térmico estudado através de técnicas Termoanalíticas. A atividade antimicrobiana dos OEs foi avaliada sobre *Streptococcus mutans*, *S. oralis*, *S. parasanguinis*, *S. salivarius*, *Porphyromonas gingivalis*, *Prevotella intermedia*, *Aggregatibacter actinomycetencomitans* e *Fusobacterium nucleatum*, pelo método da microdiluição, determinando as Concentrações Inibitórias Mínimas (CIMs); Atividade antibiofilme com *F. nucleatum* foi determinada em microplacas de poliestireno; e a atividade citotóxica sobre macrófagos foi avaliada pelo teste do MTT. Os dados da CG-EM apontaram que OEF e OEC têm a mesma constituição química, mas o OEF apresenta maior proporção de fitoconstituintes, principalmente alfa-pineno (57,23%), além de possuir maior número de picos endotérmicos e exotérmicos no estudo de Calorimetria Diferencial Exploratória (DSC). O *F.nucleatum* foi o patógeno que apresentou menor CIM, de 250  $\mu\text{g.mL}^{-1}$  para OEC e 62,5  $\mu\text{g.mL}^{-1}$  para OEF. Na atividade antibiofilme ambos os óleos inibiram, entre 1000-125  $\mu\text{g.mL}^{-1}$ , a formação de biofilme e na concentração de 50  $\mu\text{g.mL}^{-1}$ , apenas o OEC não apresentou citotoxicidade sobre macrófagos. Então, os OEs de *C. blanchetianus* Baill, apresentaram atividade antiaderente e antibacteriana sobre diversas bactérias constituintes dos biofilmes dentais e podem ser utilizados no tratamento de doenças periodontais.

## 1. INTRODUÇÃO

---

O *Croton blanchetianus* Baill (sinônimo *Croton sonderianus* Müell. Arg.), conhecido como marmeleiro preto, é um arbusto difundido largamente no nordeste do Brasil. As folhas e cascas são usadas na medicina popular para o tratamento de distúrbios gastrintestinais, reumatismo e cefaleia. Possui um teor de óleos essenciais que pode variar de 0,5 a 1,5% no seu rendimento, e, além disso, é uma planta rica em diterpenos, com atividades biológicas diversificadas (McCHESNEY et al., 1991; CHAVES, REINHARD, 2003).

Espécies de plantas do gênero *Croton* têm sido largamente estudadas em relação aos seus constituintes voláteis e não voláteis. Estudos fitoquímicos realizados com algumas espécies de ocorrência brasileira têm proporcionado o isolamento de 109 compostos pertencentes as mais variadas classes estruturais, tais como: diterpenos (35,6%), alcalóides (24,8%), flavonóides (12,8%) e triterpenos (11%). Os fenilpropanóides como anetol e derivados do eugenol, têm sido relatados como os principais componentes dos óleos essenciais de espécies de *Croton* encontradas em diferentes partes do mundo, como por exemplo, *C. zehntneri* e *C. nepetaefolius*, no Brasil; *C. molambo* e *C. cuneatus* na Venezuela; *C. pseudonivensus* e *C. suberosus* no México (RANDAU et al., 2004; SUÁREZ et al., 2005; PEREZ-AMADOR, MONROY, BUSTAMANTE, 2007; TORRES, 2008;).

Óleos essenciais (OEs) como timol, eucaliptol e mentol, demonstraram capacidade de reduzir o biofilme dental pré-formado e retardar, em ensaios clínicos, o desenvolvimento da placa bacteriana existente e, conseqüentemente, da gengivite. Os OEs são formados por compostos aromáticos, obtidos por hidrodestilação de plantas, que evaporam quando expostos à temperatura ambiente. Dentifrícios e enxaguatórios contendo OEs obtiveram selo de aceitação da *American Dental Association* (ADA), tendo em vista que ensaios *in vitro* mostraram que em altas concentrações promovem ruptura da parede celular e precipitação de enzimas, sugerindo que têm maior efetividade sobre bactérias Gram-positivas. Enquanto que, os ensaios clínicos mostraram que, quando os OEs são incorporados a dentifrícios agem sobre periodontopatógenos associados ao biofilme subgengival (SEYMOUR, 2003; FINE et al., 2007).

Com o intuito de avaliar o potencial antibacteriano de *C. blanchetianus* sobre bactérias da cavidade oral, pesquisas mostram que OEs dessa espécie vegetal inibem o crescimento de *Candida albicans*, *Lactobacillus casei*, *Streptococcus sobrinus* e *Porphyromonas gingivalis*;

microrganismos envolvidos na formação do biofilme dental associado a diversas patologias bucais, como a periodontite. Além disso, OEs de *C. argyrophyloides* quando utilizados em testes de toxicidade aguda foram considerados não-tóxicos, uma vez que apresentaram DL50 muito alta, de aproximadamente  $9,84 \text{ g.kg}^{-1}$ . Nos testes com *Artemia salina* esses compostos também não apresentaram toxicidade, indicando que plantas desse gênero podem ser utilizadas com segurança, embora que espécies de *C. blanchetianus* ainda não tenham sido avaliadas por estudos de citotoxicidade *in vitro* nem por análises de toxicidade aguda em animais (FRANÇA et al., 2012).

Então, tendo em vista as perspectivas biológicas na utilização de plantas do gênero *Croton*, essa pesquisa avaliou a atividade antibacteriana frente a patógenos aeróbios e anaeróbios da cavidade oral, os aspectos citotóxicos em culturas de macrófagos e as características químicas e termoanalíticas de óleos essenciais obtidos da casca e da folha de *Croton blanchetianus* Baill.

## 2. MATERIAIS E MÉTODOS

---

### 2.1. Coleta e identificação do material vegetal

Amostras das cascas e das folhas da planta foram coletadas no estado da Paraíba, região nordeste do Brasil, com as seguintes coordenadas (Latitude:  $7,543798/7^{\circ}32'37,67''\text{S}$ ; Longitude:  $-5,746061/35^{\circ}44'45,82''\text{W}$ ), selecionando-se espécies adultas com auxílio de um botânico especializado em plantas da caatinga, na estação conhecida como alto verão, que se estende de setembro a fevereiro respeitando-se o horário ideal de coleta. Foram realizadas exsiccatas, para identificação e verificação da autenticidade botânica do *Croton blanchetianus* Baill. seguido de depósito, com tombamento nº 4946, no herbário do Centro de Ciências Tecnológicas e Rurais (CSTR) da Universidade Federal de Campina Grande (UFCG).

### 2.2. Obtenção dos óleos essenciais

Amostras das cascas e das folhas de *C. blanchetianus* Baill foram coletadas *in natura*, armazenadas em caixas térmicas para preservar seus constituintes voláteis, e em seguida

submetidas ao processo de hidrodestilação, em um aparelho Clevenger, para obtenção dos óleos essenciais. Nesse método extrativo, utilizou-se a proporção de 200g do material vegetal para 800 mL de água destilada. Os óleos foram coletados através de separação líquido: líquido por decantação. Calculou-se o rendimento desse método extrativo em função do tempo, a fim de aperfeiçoar o processo de hidrodestilação. Após a coleta, as amostras de óleos essenciais foram armazenadas em *freezer* a  $-15^{\circ}\text{C}$ , a fim de preservar seus constituintes voláteis.

### 2.3. Cromatografia Gasosa acoplada a Espectrômetro de Massas (CG-EM)

Para avaliação química quantitativa e qualitativa utilizou-se o aparelho CG-MS – QP 2010<sup>®</sup>, com o detector da fonte de íons a  $200^{\circ}\text{C}$  e a interface a  $280^{\circ}\text{C}$ , em modo scan: 40 – 80 m/z. Utilizou-se uma coluna RTX SMS<sup>®</sup>, de 30 m de comprimento, 0,25 mm de diâmetro interno e 0,25  $\mu\text{m}$  de tamanho de partícula, com forno a  $80^{\circ}\text{C}$ ; o gás de injeção foi o He (hélio), a um fluxo de  $1\text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$ . A amostra foi submetida a uma pressão de 65 kPa, com velocidade linear de  $36,8\text{ cm}\cdot\text{s}^{-1}$ ; com o modo de injeção Split, na razão de 1:50, volume de injeção de 0,3  $\mu\text{L}$  e um tempo de corrida de 63 min. O forno foi programado utilizando método isotérmico. Para análise dos óleos essenciais, solubilizou-se 10 mg dos óleos (OEC e OEF) em 500  $\mu\text{L}$  de acetato de etila, antes de injetá-los no equipamento. Além disso, foi utilizada para a identificação, a injeção de uma série homóloga de hidrocarbonetos ( $\text{C}_8$  -  $\text{C}_{20}$ ) como referência, para o cálculo do Índice de Retenção de Kovats (IR), conforme a fórmula:

$$I = 100 \times \left[ n + (N - n) \frac{t_{r(\text{unknown})} - t_{r(n)}}{t_{r(N)} - t_{r(n)}} \right]$$

Onde:

$I$  = Índice de Retenção;

$n$  = Número de átomos de carbono da série de n-alcenos menor;  $N$

= Número de átomos de carbono da série de n-alcenos maior;  $t$

$t_{r(\text{unknown})}$  = Tempo de Retenção do composto desconhecido;

$t_{r(n)}$  = Tempo de Retenção do carbono da série de n-alcenos menor;

$t_{r(N)}$  = Tempo de Retenção do carbono da série de n-alcenos maior.

Os Índices de Retenção (IR) dos compostos presentes nas amostras de óleos essenciais foram calculados e, junto aos padrões de fragmentação determinados pelo CG-EM, identificou-

se os compostos comparando com os valores apresentados na literatura, utilizando-se Adams (2007) e NIST 05 Mass Spectral Library.

## 2.4. Análise Térmica

As curvas de DSC foram obtidas em calorímetro TA Instruments, modelo DSC Q20<sup>®</sup> utilizando cadinhos de alumínio com cerca de  $2,0 \pm 0,1$  mg de amostra, em atmosfera de nitrogênio (fluxo de  $50 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$ ). Os experimentos foram realizados a partir da temperatura de  $25 \text{ }^\circ\text{C}$ , resfriando-se as amostras de OEC e OEF até  $-70 \text{ }^\circ\text{C}$ , e em seguida, aquecendo-as até a temperatura de  $400 \text{ }^\circ\text{C}$ , utilizando-se razão de aquecimento/resfriamento de  $5 \text{ }^\circ\text{C} \cdot \text{min}^{-1}$ . O índio (P.F.  $156,6 \text{ }^\circ\text{C}$ ) foi utilizado como padrão para a calibração do equipamento. Os dados foram analisados usando o software TA Instruments Universal Analysis 2000, 4.7A.

As curvas termogravimétricas não-isotérmicas foram obtidas em um analisador simultâneo TG/DTA/DSC, modelo Q600<sup>®</sup>, TA Instruments, utilizando cadinhos de alumina, com cerca de  $8,0 \pm 0,1$  mg de amostra de OEC e OEF, em atmosfera de nitrogênio (fluxo de  $50 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$ ). Os experimentos foram realizados no intervalo temperatura entre  $25$  e  $900 \text{ }^\circ\text{C}$ , utilizando-se razão de aquecimento de  $5 \text{ }^\circ\text{C} \cdot \text{min}^{-1}$ . O aparelho foi calibrado com oxalato de cálcio monohidratado e os dados foram analisados usando o software TA Instruments Universal Analysis 2000, 4.7A.

## 2.5. Avaliação da atividade antimicrobiana sobre patógenos orais

Na avaliação da atividade antimicrobiana foram utilizadas cepas padrão *American Type Culture Collection* (ATCC) de *Streptococcus parasanguinis* (903), *Streptococcus salivarius* (7073), *Streptococcus oralis* (10557) e *Streptococcus mutans* (25175) utilizando-se o método da microdiluição descrito pelo *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI, 2005). E, os periodontopatógenos representados por *Prevotella intermedia* (25611), *Porphyromonas gingivalis* (33277), *Fusobacterium nucleatum* (25586) e *Aggregatibacter actinomyceten comitans* (33384), utilizando-se o método de microdiluição para bactérias anaeróbias descrito pela *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI, 2008). Todos os *Streptococcus* sp. foram cultivados em caldo BHI (Brain Heart Infusion), em condições microaerófilas, em jarra de anaerobiose, a  $37 \pm 0,5 \text{ }^\circ\text{C}$  por 24 horas. Os microrganismos anaeróbios foram cultivadas em TSB (Trypticase Soy Broth) contendo  $1 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$  de extrato de levedura,  $5 \text{ } \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$  de hemina

e  $1 \mu\text{g.mL}^{-1}$  de menadiona, sob condições anaeróbicas, com uma atmosfera de 90% de  $\text{N}_2$ , 5% de  $\text{CO}_2$ , e 5% de  $\text{H}_2$ , por 48 horas, a  $37 \pm 0,5 \text{ }^\circ\text{C}$ . O inóculo bacteriano para *Streptococcus* sp. foi utilizado na concentração de  $1,0 \times 10^6 \text{ UFC.mL}^{-1}$ , e para os periodontopatógenos na concentração de  $5,0 \times 10^8 \text{ UFC.mL}^{-1}$ , padronizado em espectrofotômetro no comprimento de onda de 625nm.

Em microplacas de 96 poços (TPP<sup>®</sup>), procedeu-se com a microdiluição, utilizando soluções-testes nas concentrações de 4000  $\mu\text{g}$  das amostras dos óleos essenciais da casca (OEC) e da folha (OEF): 1 mL de solvente (100  $\mu\text{L}$  de álcool 96°: 900  $\mu\text{L}$  de água destilada), sendo realizadas oito diluições seriadas nos poços das respectivas colunas da microplaca. Os solventes foram utilizados como controle negativo e digluconato de clorexidina (Sigma Aldrich<sup>®</sup>) a 0,12% como controle positivo. Os testes foram realizados em triplicata, e as microplacas foram incubadas em anaerobiose, por 48 horas, a  $37 \pm 0,5^\circ\text{C}$ . Após esse período, para determinação da concentração inibitória mínima (CIM) foi adicionado 20  $\mu\text{L}$  de resazurina (Sigma Aldrich<sup>®</sup>) a 0,01%, verificando-se a redução colorimétrica do corante para azul nos poços onde não houve presença de bactérias viáveis.

## 2.6. Atividade antibiofilme sobre *Fusobacterium nucleatum*

Nessa análise foi necessária a utilização de saliva, coletada do pesquisador, a qual seguiu o protocolo de Guggeheim et al. (2001). No ensaio do biofilme utilizaram-se cepas de *F. nucleatum* (ATCC 25585), nas mesmas condições de cultivo e concentração do inóculo, descritas no item 2.5, seguindo o protocolo de Stepanovic et al (2000) e Islam et al (2009), com algumas modificações. Primeiramente 100  $\mu\text{L}$  de saliva foram pipetados em placas de 96 poços, mantendo-as à temperatura ambiente por 2 horas. Depois desse período, o conteúdo salivar foi removido e os poços lavados uma vez com 100  $\mu\text{L}$  de tampão PBS. Em seguida adicionou-se 100  $\mu\text{L}$  de meio TSB (contendo  $1 \text{ mg.mL}^{-1}$  de extrato de levedura,  $5 \mu\text{g.mL}^{-1}$  de hemina,  $1 \mu\text{g.mL}^{-1}$  de menadiona e 5% de glicose); 100  $\mu\text{L}$  das soluções das amostras de OEC e OEF a serem testadas em várias concentrações; e 100  $\mu\text{L}$  do inóculo bacteriano  $5,0 \times 10^8 \text{ UFC.ml}^{-1}$ . Os testes foram feitos em triplicata e as placas mantidas a  $37 \pm 0,5^\circ\text{C}$  em condições de anaerobiose. Após esse período o conteúdo dos poços foi removido e estes foram lavados duas vezes com solução salina estéril, para remover as bactérias fracamente aderidas, e mantidas à temperatura ambiente para secagem. Depois de secas, adicionou-se 200  $\mu\text{L}$  de cristal de violeta a 1%, mantendo-o por 40 min, em seguida os poços foram lavados duas vezes com solução

salina estéril, e mantidas à temperatura ambiente por 20 min para secagem. Em seguida, o conteúdo dos poços foi ressuscitado com 200  $\mu\text{L}$  de álcool etílico 95° durante 40 min, logo após 150  $\mu\text{L}$  do conteúdo dos poços foi transferido para outra microplaca, na qual a densidade ótica foi mensurada através de um espectrômetro (Biotrak II Plate Reader) com comprimento de onda de 625 nm. Os dados das absorvâncias dos poços com soluções-teste foram comparados aos poços com meio de cultura e sem inóculo e aos poços com meio de cultura+inóculo; clorexidina a 0,12% (Sigma Aldrich<sup>®</sup>) foi utilizada como controle positivo.

## 2.7. Teste de citotoxicidade em macrófagos

Os procedimentos experimentais dos testes de viabilidade celular seguiram a metodologia proposta por HOSRY et al (2014). Foram utilizados macrófagos imortalizados (RAW 269.7) em Meio Eagle de Dulbecco modificado - DMEM (GIBCO<sup>®</sup>, United Kingdom) acrescido de 10% de soro fetal bovino (GIBCO<sup>®</sup>) e estreptomicina (100  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ), uma vez que essas células estão relacionadas com a resposta imune do organismo no desenvolvimento das doenças periodontais.

As células foram expostas a diversas concentrações de OEC e OEF em DMEM acrescido de 1% de soro fetal bovino (GIBCO<sup>®</sup>), os testes foram feitos em sextuplicata e a microplacas foram incubadas por 48 horas. Depois desse período o conteúdo dos poços foi desprezado, sendo os mesmos submetidos ao teste colorimétrico do MTT. A viabilidade mitocondrial, e conseqüentemente, a viabilidade celular, foi quantificada pela redução do MTT (um sal de coloração amarela e solúvel em água) a formazan (sal de coloração arroxeada e insolúvel em água) pela atividade daquelas enzimas. Dessa forma, a redução do MTT a formazan, foi considerada diretamente proporcional à atividade mitocondrial e a viabilidade celular.

## 2.8. Análise Estatística

Para análise estatística, utilizou-se o software IBM SPSS Statistics, version 16.0, Chicag, USA, através do qual se confeccionou um banco de dados, e as médias dos resultados obtidos nos testes de atividade antibiofilme e de viabilidade celular, foram analisadas através do ANOVA, com nível de significância de 0,05.

### 3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

---

As análises químicas por cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massa (CG-EM), mostraram que não há diferenças qualitativas entre os óleos da casca e da folha do *C. blanchetianus* Baill. Como podemos observar na Figura 1, ambos os óleos possuem o mesmo espectro cromatográfico, apresentando compostos com picos e tempos de retenção semelhantes. Entretanto, há diferenças quantitativas, e o óleo essencial obtido da folha apresenta maior teor de metabólitos, representado pela maior área apresentada sob os picos, quando comparado ao óleo extraído da casca.

Observou-se semelhança na constituição química dos óleos, constatada pelo padrão de fragmentação de íons, obtida por espectroscopia de massa e comparada à biblioteca do equipamento, NIST 05 Mass Spectral Library (Tabela 1). Por conseguinte, essa análise foi ratificada pela comparação do índice de retenção, obtido pela injeção de uma série de carbonos-padrão (C8-C20) que eluíram sob as mesmas condições das amostras dos óleos, podendo-se comparar as características do composto desconhecido, como padrão de fragmentação, índice de retenção e tempo de retenção, aos compostos referenciados por Adams, 2007.

Os compostos majoritários dos óleos essenciais de *C. blanchetianus* Baill. foram representados por: terpenos como o  $\alpha$ -pineno (OEC:58,64%;OEF:57,23%), o  $\beta$ -pineno (OEC:5,47%; OEF:5,57%) e o D-limoneno (OEC:4,61%; OEF:4,68%) e sesquiterpenos bicíclicos como  $\gamma$ -cadinene (OEC:7,16%; OEC:6,96%) e  $\epsilon$ -cadinene (OEC:1,75%;OEF:1,72%). Através da isomerização térmica do  $\beta$ -pineno é possível sintetizar o mirceno e o D-limoneno, que são utilizados como intermediários para obter álcoois terpênicos e aromas químicos. Embora não seja possível elucidarmos os mecanismos de obtenção de tais compostos, o mirceno foi observado na proporção de 1,32% no OEC e de 1,43% no OEF.

Figura 1: Cromatogramas obtidos a partir de CG-EM das amostras de OEC (preto) e OEF (vermelho). Eixo horizontal: Tempo de retenção ( $T_R$ ) (em minutos); Eixo vertical: Abundância relativa dos constituintes na amostra. A:  $T_R(0-12)$ ; B:  $T_R(12-16)$ ; C:  $T_R(22-30)$  e D:  $T_R(30-35)$ .

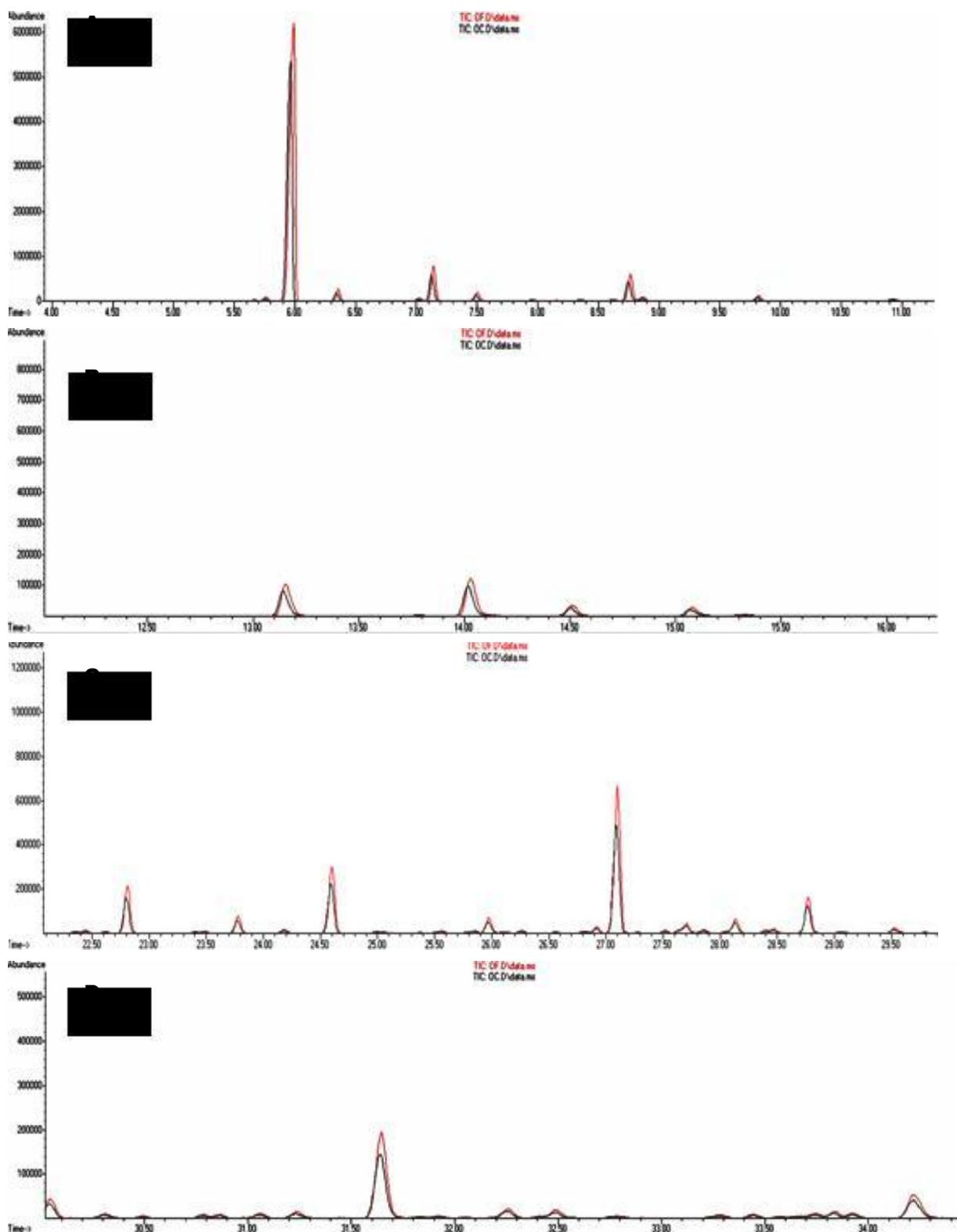
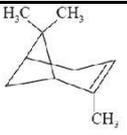
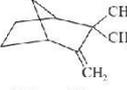
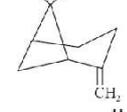
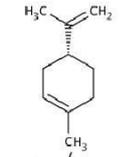
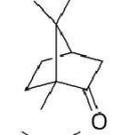
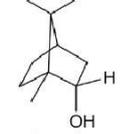
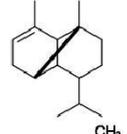
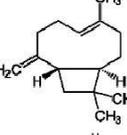
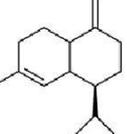
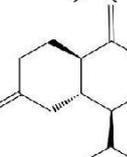


Tabela 1: Constituintes dos óleos essenciais da casca (OEC) e da folha (OEF) de *blanchetianus* Baill identificados por CG-MS.

C.

Nome do Composto	Fórmula Estrutural	O.E.C			Nist		O.E.F			Nist Adams, 2007	
		TR <sub>min</sub>	%	IR	%	TR <sub>min</sub>	%	IR	%	TR <sub>min</sub>	IR
$\alpha$ -pineno		5,96	58,64	933,7	96	5,98	57,23	934,4	96	5,85	932
Canfeno		6,34	1,60	947,5	98	6,35	1,67	948,0	97	6,26	946
$\beta$ -pineno		7,12	5,47	976,2	98	7,14	5,57	976,7	97	7,14	974
mirceno		7,49	1,32	989,6	97	7,50	1,34	990,1	88	7,43	988
D-limoneno		8,74	4,61	1026,8	98	8,76	4,68	1027,2	95	8,69	1024
Cânfora		13,14	1,02	1142,3	95	13,15	0,98	1142,5	98	13,28	1141
borneol		14,02	1,25	1163,5	98	14,03	1,19	1163,8	94	14,29	1165
$\alpha$ -copaeno		22,80	2,19	1372,4	96	22,81	2,14	1372,7	98	23,49	1374
(E)-cariofileno		24,59	3,20	1415,7	96	24,60	3,12	1415,8	96	25,36	1417
$\gamma$ -Cadineno		27,09	7,16	1477,3	90	27,10	6,97	1479,5	90	27,91	1478
$\epsilon$ -Cadineno		28,76	1,75	1519,8	97	28,77	1,72	1520,0	94	29,72	1522

TR<sub>min</sub>: Tempo de retenção (em minutos); (%): Porcentagem da área total integrada para o cromatograma; IR: Índice de Retenção de Kovats; Nist (%): Porcentagem de similaridade com a NIST 14 Mass Spectral Library.

Estudo feito com óleos essenciais extraídos de diversas partes de *C. blanchetianus* (folhas, flores, raízes e casca do lenho) coletadas em diferentes regiões do Ceará, em diferentes períodos do dia, possibilitou investigar e identificar 32 compostos dentre os quais  $\beta$ -felandreno (20,4% nas folhas), biciclogermacreno (29,1% nas flores, e 17,7% nas folhas),  $\beta$ -elemeno (17,8% nas flores, e 22,0% nas cascas do caule), cipereno (14,2% nas raízes) e germacreno D (12,8% nas cascas do caule), que se destacaram como constituintes majoritários da planta (DOURADO, 2005).

Embora esse estudo não tenha identificado os mesmos compostos majoritários, é necessário enfatizar que alguns fatores interferem na composição química inerente aos vegetais. A estação climática, o período da coleta, a idade e o desenvolvimento fisiológico, ocasionam variações circadianas na planta, além de interferirem na quantidade, na proporção relativa e, até mesmo, na natureza dos constituintes ativos, como óleos essenciais. Fatores mecânicos aos quais as plantas estão susceptíveis, tais como ferimentos, ou mesmo estímulos causados por agentes externos, como granizo e a invasão de patógenos, podem influenciar a expressão do metabolismo secundário, o que explica divergências de estudos quanto à composição química de plantas da mesma espécie (VAZQUEZ-FLOTA et al., 2004; ZHENG, WU, 2004; SCHWOB et al., 2004; ANGELOPOULOU, DEMETZOS, PERDETZOGLU, 2002).

No âmbito termoanalítico, os dados da análise térmica apresentados nas tabelas 2 e 3, refletem um comportamento diferenciado dos óleos essenciais. Estas tabelas mostram que tanto na TG quanto na DSC, foram observados menos eventos térmicos no OEC em relação ao OEF, nos processos de degradação/decomposição térmica, algumas substâncias aparentam estar ausentes. Como de acordo com as análises de CG-EM, as amostras de OEC apresentam, proporcionalmente, menor quantidade de constituintes químicos, os eventos térmicos se sobrepõem (figura 2), dificultando a análise da composição química desse óleo, através de TG ou DSC.

Em contrapartida, os dados de TG e DSC do OEF (tabelas 2 e 3) apresentam variados eventos de decomposição e variações de entalpia. Na figura 2 observamos um pico de cristalização (-28,73°C), exotérmico, seguido de posterior fusão (-1,18°C), endotérmico, provavelmente refletindo a presença de água na amostra avaliada, o qual não foi verificado na análise do OEC. A quantidade de picos endotérmicos, coincidentes com sucessivos processos de decomposição, envolvendo as etapas de 6 a 8 na TG, mostram os processos de degradação dos óleos essenciais, que se iniciam em 88,44°C. Dessa forma, é importante observar que durante o processamento de uma possível formulação farmacêutica, utilizando esse insumo

ativo, é necessário que a temperatura utilizada não ultrapasse a citada acima, para que os constituintes da amostra não se volatilizem e não se perca o seu potencial biológico.

Tabela 2: Dados de Termogravimetria (TG) referentes às etapas de decomposição nas amostras de OEC e OEF.

Amostras	Etapas	T <sub>I</sub>	T <sub>F</sub>	<sup>a</sup> Perda	<sup>a</sup> Resíduo
OEF	1	30,00	118,57	44,79	-
	2	118,57	189,47	43,86	-
	3	189,47	428,63	9,46	0,61
OEC	1	30,00	79,82	94,10	0,983

T<sub>I</sub>: Temperatura Inicial (em °C); T<sub>F</sub>: temperatura Final (em °C);  
<sup>a</sup>(%): Dados expressos em porcentagem.

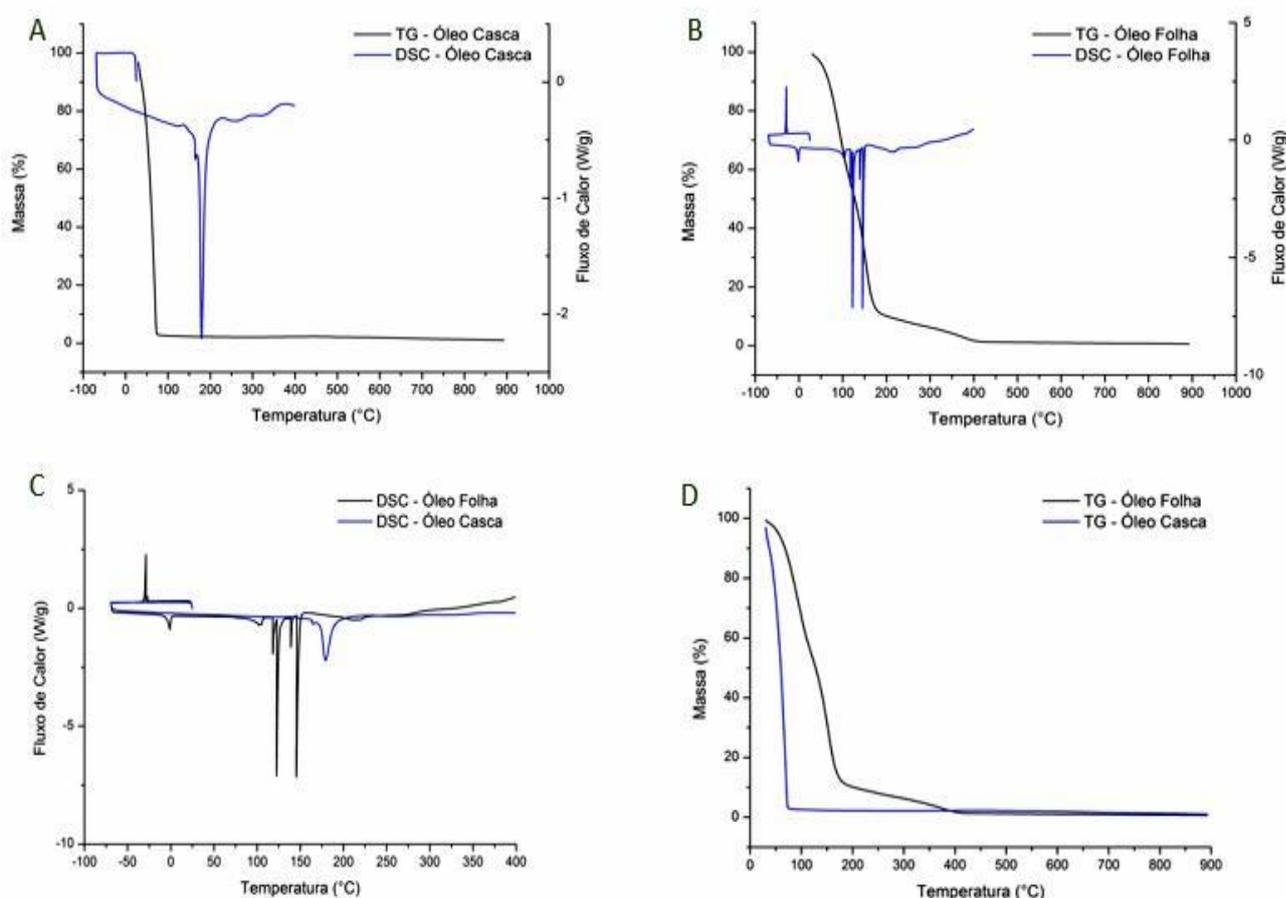
Tabela 3: Dados de calorimetria diferencial exploratória (DSC) referentes aos processos de transições endotérmicos e exotérmicos, observados nas amostras de OEC e OEF.

Amostras	Etapas	T <sub>I</sub>	T <sub>P</sub>	T <sub>F</sub>	ΔE
OEF	1	-26,89	-27,09	-28,85	-197,00
	2	-28,85	-28,73	-32,58	-21,52
	3	-11,07	-1,18	-1,81	24,68
	4	88,44	102,05	109,20	31,48
	5	117,88	118,10	122,73	28,89
	6	122,73	122,36	131,56	124,80
	7	138,81	138,97	144,24	15,10
	8	145,75	145,32	153,86	143,10
OEC	1	139,95	179,62	222,54	309,10

T<sub>I</sub>: Temperatura Inicial (°C); T<sub>P</sub>: Temperatura de Pico(°C); T<sub>F</sub>: Temperatura Final(°C); ΔE: Variação de energia na etapa, em J. g<sup>-1</sup>.

A verificação dos pontos de ebulição/vaporização (PE) (Merck Index, 2013) permite apontar a presença de alguns compostos, que corroboram com os dados do CG-EM. Na etapa 1 da TG do OEF, ocorre a maior perda de massa (44,74%), a qual coincide com a etapa 8 da DSC, que possui um pico de 153,8°C, esse processo endotérmico se assemelha ao PE do  $\alpha$ -pineno (152,39°C), seu constituinte em maior proporção como mostra a tabela 1. Além dessa relação, observa-se na etapa 6 da DSC, que envolve o intervalo entre 122,73°C e 131,56°C, a perda de constituintes voláteis, como os cadinenos (PE 124°C) e o E-cariofileno (130,8°C).

Figura 2: Curvas TG e DSC dos óleos essenciais da casca (OEC) e da folha (OEF) de *C. blanchetianus* Baill. A: Curvas TG e DSC para OEC; B: Curvas TG e DSC para OEF; C: Sobreposição das curvas DSC de OEC e OEF; D: Sobreposição das curvas TG de OEC e OEF.



Na avaliação da atividade dos óleos essenciais frente às bactérias envolvidas na formação do biofilme dental (Tabela 4), verificou-se uma maior ação inibitória dos óleos sobre os periodontopatógenos, colonizadores tardios, em relação aos *Streptococcus* sp., que são

colonizadores iniciais na formação da placa dentária. Essa ação mais efetiva sobre patógenos Gram-negativos, como *F. nucleatum* e *P. gingivalis* pode estar relacionada ao mecanismo de ação dos óleos essenciais, que são solúveis na camada bilipídica da membrana celular, e portanto, têm a habilidade de desestabilizar e conseqüentemente, romper ou penetrar na estrutura lipídica presente em bactérias Gram-negativas, o que não ocorre em microrganismos Gram-positivos, providos de uma barreira de peptidoglicanos (KOYAMA et al., 1997; TROMBETTA et al., 2005).

Tabela 4: Concentrações inibitórias mínimas (CIMs) de OEC e OEF frente a periodontopatógenos e *Streptococcus* sp.

Óleos Essenciais	CIM ( $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ )			
	<i>S. mutans</i>	<i>S. oralis</i>	<i>S. parasanguinis</i>	<i>S. salivarius</i>
<b>OEC</b>	1000	500	500	>1000
<b>OEF</b>	500	500	500	>1000
	<i>P. gingivalis</i>	<i>P. intermedia</i>	<i>A. actinomycetencomitans</i>	<i>F. nucleatum</i>
<b>OEC</b>	250	500	>1000	250
<b>OEF</b>	125	250	>1000	62,5

Através da análise da tabela 4, verifica-se que os óleos essenciais obtidos da folha apresentaram maior espectro de ação, tanto sobre bactérias anaeróbias facultativas como o *S. mutans*, (CIM de  $500 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  para OEF e de  $1000 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  para OEC), quanto sobre anaeróbios restritos como *P. gingivalis* ( $250 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ OEC e  $125 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ OEF) e *P. intermedia* ( $500 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ OEC e  $250 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ OEF). Essa variação na atividade antibacteriana pode estar relacionada com as diferenças nas quantidades de compostos bioativos presentes nos óleos essenciais, uma vez que segundo os cromatogramas da figura 1 as amostras de OEF possuem uma maior quantidade de fitoconstituintes, provavelmente relacionados com sua atividade antibacteriana.

A ação dos óleos essenciais de *C. blanchetianus* Baill sobre *P. gingivalis* valida seu espectro antimicrobiano na terapêutica da doença periodontal. Acredita-se que, dentre as várias bactérias presentes no biofilme subgingival, esse patógeno seja o principal microrganismo associado com a periodontite crônica. Evidências sugerem que a redução nos níveis dessa bactéria em bolsas periodontais está associada com uma melhora nos sinais clínicos da doença,

pois esse patógeno possui a capacidade de invadir as células do epitélio juncional, além de induzir a degradação da matriz celular (PATHIRANA, O'BRIEN-SIMPSON, REYNOLDS, 2010; TRIBBLE, LAMON, 2010).

Dentre os estreptococos orais testados, os mais sensíveis às amostras de OEC e OEF foram o *S. oralis* e o *S. parasanguinis*, ambos apresentaram CIM de  $500 \mu\text{g.mL}^{-1}$ . Essas bactérias estão envolvidas na produção de  $\text{H}_2\text{O}_2$ , substância que estimula a liberação de DNA bacteriano, facilitando os mecanismos de coagregação na placa bacteriana; induz a morte celular por estresse oxidativo; e, conseqüentemente, pode agir como citocina, aumentando a resposta inflamatória na periodontite (OKAHASHI et al., 2010). Dessa forma esses óleos essenciais possuem amplas perspectivas para serem utilizados como agentes químicos no tratamento da doença periodontal.

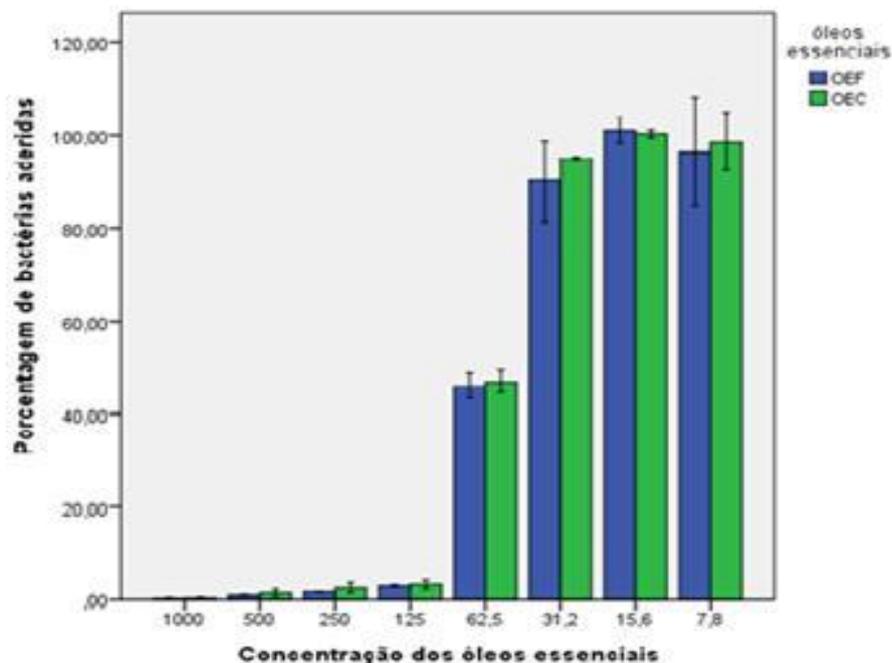
Os fitoconstituintes presentes nas amostras de OEC e OEF, representados na tabela 2, estão presentes em diversos estudos com outros vegetais que também possuem ação antibacteriana. Cânfora e  $\alpha$ -pineno têm inibido o crescimento de bactérias Gram-positivas e Gram-negativas; e D-limoneno produziu halos de inibição em testes de difusão em ágar com *Streptococcus* sp. Em estudo feito com óleos essenciais brutos, constituídos majoritariamente de (E)-cariofileno e germacreno- D, em testes de microdiluição sobre estreptococos orais, verificou-se que quando associados, esses terpenos apresentam CIM de  $20 \mu\text{g.mL}^{-1}$  para *S. mutans* e de  $18 \mu\text{g.mL}^{-1}$  para *S. mitis*. Entretanto, quando isolados, os compostos apresentaram menor efeito inibitório, apresentando CIM de  $400 \mu\text{g.mL}^{-1}$  para ambos estreptococos orais, sinalizando que diversos componentes dos óleos essenciais agem por mecanismo de sinergismo (BILIA et al., 2014; TADTONG, WATTHANACHAIYINGCHAROEN, KAMKAEN, 2014).

A maioria dos constituintes dos óleos essenciais exercem seus efeitos antimicrobianos através de modificações na estrutura da parede celular dos microrganismos. Mas especificadamente, altera a permeabilidade de membrana citoplasmática pela modificação no gradiente de íons hidrogênio ( $\text{H}^+$ ) e potássio ( $\text{K}^+$ ), causando a interrupção dos processos essenciais da célula, como transporte de elétrons, translocação de proteínas, etapas da fosforilação e outras reações dependentes de enzimas, resultando em perda do controle quimiosmótico da célula afetada e, conseqüentemente, a morte bacteriana (DORMAN, DEANS, 2000).

O *F. nucleatum* foi o microrganismo mais sensível, dentre as bactérias testadas, apresentou CIM de  $250,0 \mu\text{g.mL}^{-1}$  para OEC e de  $62,5 \mu\text{g.mL}^{-1}$  para OEF. Os dados da atividade

antiaderente, na qual foi desenvolvido um biofilme monoespécie com esse patógeno, demonstraram que esses óleos são eficazes em culturas planctônicas e aderidas. De acordo com a figura 3, os óleos apresentaram atividades antiaderentes semelhantes, tendo em vista que entre 1000 e 125  $\mu\text{g.mL}^{-1}$  inibiram a adesão de praticamente todas as cepas de *F. nucleatum*. Enquanto que, na concentração de 62,5  $\mu\text{g.mL}^{-1}$ , 45,98% ( $\pm 1,07$ ) e 46,93% ( $\pm 0,96$ ) das bactérias permaneceram aderidas, respectivamente, nos testes com OEF e OEC. A partir da concentração de 31,2  $\mu\text{g.mL}^{-1}$ , praticamente todas as bactérias permaneceram aderidas, não havendo diferenças estatisticamente significativas entre as médias obtidas para OEF e OEC.

Figura 3: Percentual de *F. nucleatum*, aderidos após 24 horas de tratamento, com diversas concentrações (em  $\mu\text{g/ml}$ ) de OEC e OEF.



Os resultados evidenciados na figura 3, apontam que o *F. nucleatum* foi capaz de se aderir a placas de poliestireno tratadas com saliva, formando biofilmes monoespécies, e que até a concentração de 125  $\mu\text{g.mL}^{-1}$  os óleos essenciais foram capazes de inibir essa aderência. Embora haja limitações nesse estudo, pois não avaliamos a ação desses óleos na aderência desse patógeno à estrutura dental, podemos observar que há perspectivas na utilização das amostras dos óleos essenciais avaliadas no tratamento da doença periodontal. Esse aspecto é importante, uma vez que o *F. nucleatum* é uma das bactérias Gram-negativas, que se estabelecem nos biofilmes dentários e exercem um papel fundamental nas interações físicas entre os *Streptococcus* sp. e os periodontopatógenos, contribuindo para o estabelecimento de condições

propícias à agregação de bactérias anaeróbias, intolerantes ao oxigênio (METZGER et al., 2009; AMMANN, BELIBASAKIS, THURNHEER, 2013).

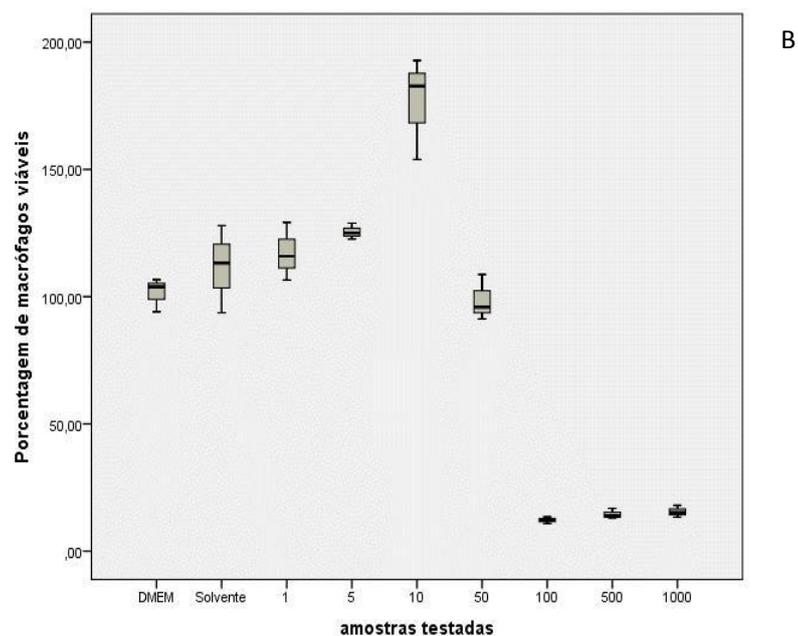
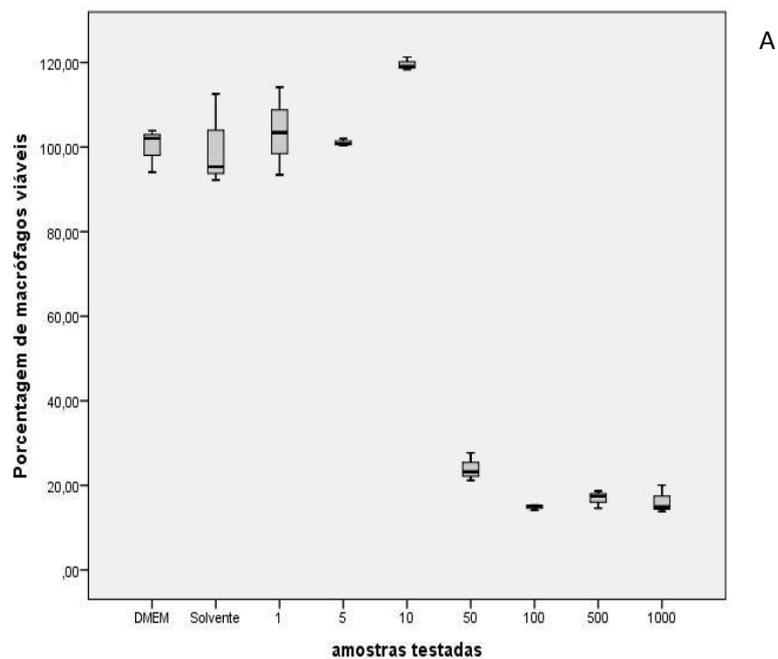
Tabela 5: Relação das médias dos percentuais de *F. nucleatum* aderidas, entre as diversas concentrações testadas das amostras de OEC e OEF.

Concentrações Testadas ( $\mu\text{g.mL}^{-1}$ )	OEF	OEC	*p-valor
	Média $\pm$ DP	Média $\pm$ DP	
1000	1,48 $\pm$ 0,56	1,54 $\pm$ 0,94	0,120
500	1,34 $\pm$ 0,85	1,54 $\pm$ 1,21	0,850
250	1,86 $\pm$ 0,77	2,02 $\pm$ 0,42	0,055
125	2,27 $\pm$ 0,81	2,30 $\pm$ 0,64	0,066
62,5	45,98 $\pm$ 1,07	46,59 $\pm$ 0,96	0,238
31,2	82,44 $\pm$ 12,85	95,73 $\pm$ 2,45	0,055
15,6	101,42 $\pm$ 6,38	98,93 $\pm$ 8,76	0,213

DP: Desvio-Padrão;\*p-valor: valores significativos obtidos no ANOVA, com nível de significância de 0,05.

Na análise dos testes de citotoxicidade com os óleos essenciais da planta, pode-se observar através da figura 4 e da tabela 6, a ocorrência de variações na toxicidade dos óleos. Enquanto que, nas concentrações de 1000, 500 e 100  $\mu\text{g.mL}^{-1}$  as amostras apresentaram citotoxicidade no teste de MTT, diminuindo o percentual de macrófagos viáveis em relação aos controles, tratados com meio de cultura DMEM, outras concentrações não induziram o mesmo comportamento biológico. Ressalta-se, através da tabela 6 que se utilizando OEF a 50  $\mu\text{g.mL}^{-1}$ , apenas 24% ( $\pm$ 3,34) permaneceram viáveis, enquanto que o OEC, na mesma concentração, não exerceu efeitos tóxicos, permanecendo 98,63% ( $\pm$ 9,02) dos macrófagos viáveis, sendo essa diferença entre as amostras estatisticamente significativa ( $p < 0,05$ ). Dessa forma pode-se mencionar que na concentração de 50  $\mu\text{g.mL}^{-1}$ , o OEC não foi citotóxico, enquanto que essa propriedade só foi alcançada pelo OEF a 10  $\mu\text{g.mL}^{-1}$ , conforme dados da tabela 6 e distribuição amostral da figura 4.

Figura 4: Porcentagem de macrófagos RAW 269.7 viáveis após 48h de tratamento com diversas concentrações (em  $\mu\text{g/ml}$ ) das amostras de OEF (A) e OEC (B).



Essas conclusões são suportadas pela análise cromatográfica, apresentada na figura 1, segundo a qual o OEF possui maior quantidade de constituintes químicos quando comparado ao OEC, e provavelmente uma maior quantidade de bioativos determina um efeito biológico mais pronunciado. Tal comportamento biológico do OEF é constatado pela maior atividade antibacteriana, conforme os dados da tabela 5, e maior efeito citotóxico, como mostram os resultados dos testes de viabilidade celular. Além disso, estudos apontam que o  $\alpha$ -pineno e o

$\beta$ -pineno, compostos presentes nas amostras de OEC e OEF, quando isolados apresentam citotoxicidade sobre macrófagos na concentração de  $250 \mu\text{g.mL}^{-1}$ , reduzindo a viabilidade celular em 57,7%, o que explica o efeito tóxico das amostras em altas concentrações neste estudo. Quando avaliado sobre outras células sanguíneas, como linfócitos, outra análise também constatou que o  $\alpha$ -pineno diminuiu a viabilidade celular, utilizando testes de liberação de LDH (lactate desidrogenase) e MTT, apesar de não causar danos ao DNA (SILVA et al., 2012; TURKEZ, AYDIN, 2013).

Tabela 6: Relação das médias da viabilidade celular para macrófagos RAW 269.7 entre as diversas concentrações testadas das amostras de OEC e OEF.

Concentrações Testadas ( $\mu\text{g.mL}^{-1}$ )	OEF	OEC	p-valor
	Média $\pm$ DP	Média $\pm$ DP	
<b>1000</b>	16,26 $\pm$ 3,32	15,52 $\pm$ 2,33	0,766
<b>500</b>	16,89 $\pm$ 2,07	14,55 $\pm$ 1,97	0,230
<b>100</b>	14,85 $\pm$ 0,62	12,21 $\pm$ 1,30	0,340
<b>50</b>	24,00 $\pm$ 3,34	98,63 $\pm$ 9,02	0,000*
<b>10</b>	119,5 $\pm$ 1,54	176,46 $\pm$ 20,18	0,008*
<b>5</b>	101,02 $\pm$ 0,86	125 $\pm$ 3,14	0,000*
<b>1</b>	103,67 $\pm$ 10,35	117,21 $\pm$ 11,38	0,202

DP: Desvio-Padrão;\*p-valor: valores significativos obtidos no ANOVA, com nível de significância de 0,05.

Considerando que os macrófagos são células essenciais para a resposta imunológica do organismo, esse ensaio toxicológico é de fundamental importância na triagem de produtos naturais, com perspectivas na doença periodontal. Na periodontite ocorre uma resposta inflamatória exacerbada, com a presença de antígenos bacterianos induzindo às células de defesa, como os macrófagos, a produzirem mediadores inflamatórios, como interleucinas, fatores de necrose tumoral, metaloproteinases e prostaglandinas. Portanto, é necessário que se utilize, na terapêutica com produtos naturais, concentrações que não sejam citotóxicas às células de defesa, para não causarem danos celulares que aumentariam a resposta inflamatória,

resultando em maiores danos aos tecidos periodontais (JAGANNATHAN, LAVU, RAO, 2014).

Uma importante observação que pode ser feita através dos resultados dos testes de citotoxicidade, refere-se ao aumento no número de células viáveis, em relação aos grupos-controle tratados com DMEM, quando foram empregadas concentrações de  $10 \mu\text{g.mL}^{-1}$  das amostras de OEC e OEF, o que pode ser observado nas figuras 4, 5 e 6. Esse comportamento biológico pode estar relacionado à presença de agentes que retardam as reações de degradação oxidativa, reduzindo a velocidade de oxidação celular pela complexação com íons metálicos ou pela inibição de radicais livres. Terpenos, como os pinenos e o limoneno, e sesquiterpenos, como os cadinenos, constituintes das amostras testadas, são exemplos de agentes anti-oxidantes encontrados em óleos essenciais de diversos vegetais (SILVA et al., 2012; TURKEZ, AYDIN, 2013).

Figura 5: Fotomicrografias das culturas de macrófagos RAW 269.7, após 48 horas de tratamento com diferentes concentrações do OEC de *C. blanchetianus* Baill, feitas em microscópio invertido de fase (Nikon Eclipse TS 100), 100x; A: 1000; B: 500; C:100; D:50; E:10; F:5; G:1 ( $\mu\text{g.mL}^{-1}$ ); H: DMEM; I: Solvente (DMEM + álcool 20%).

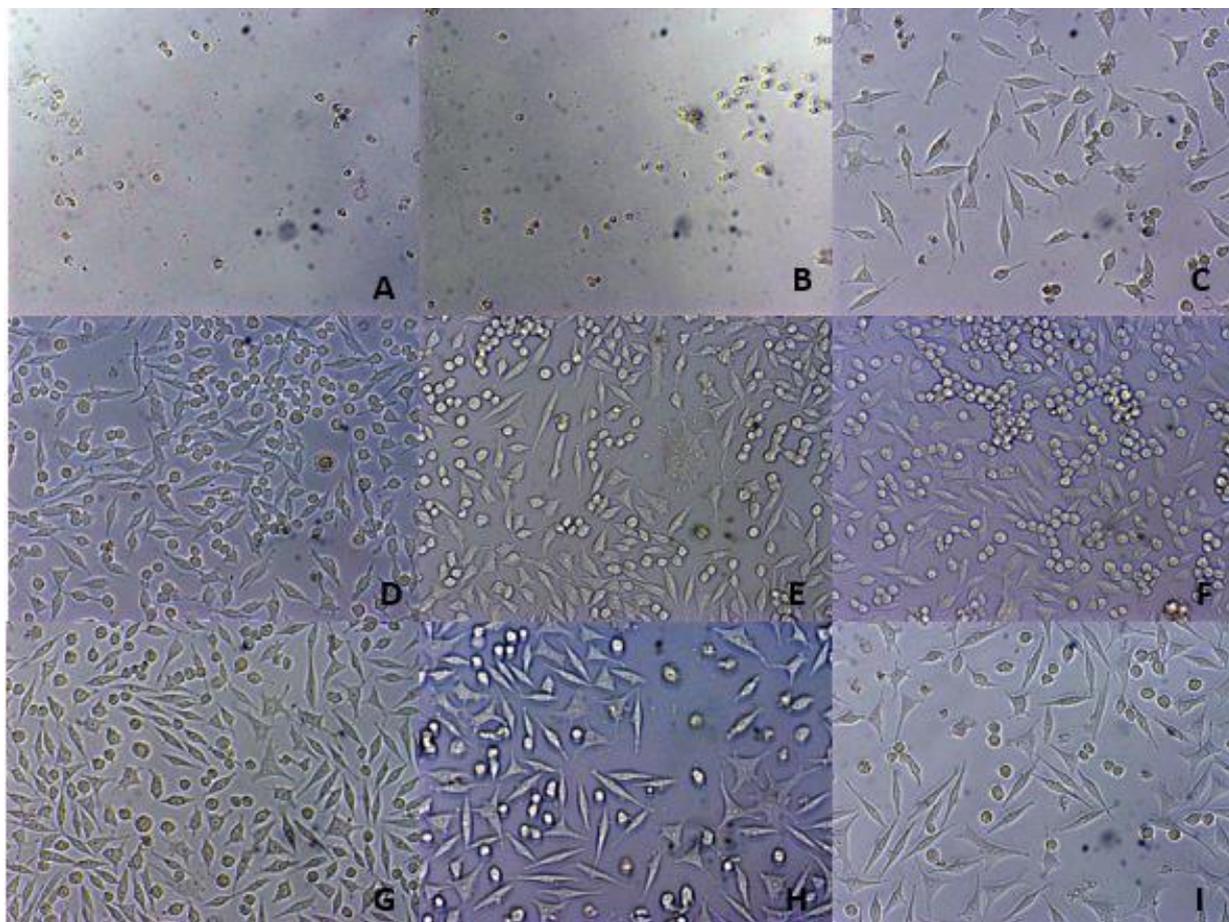
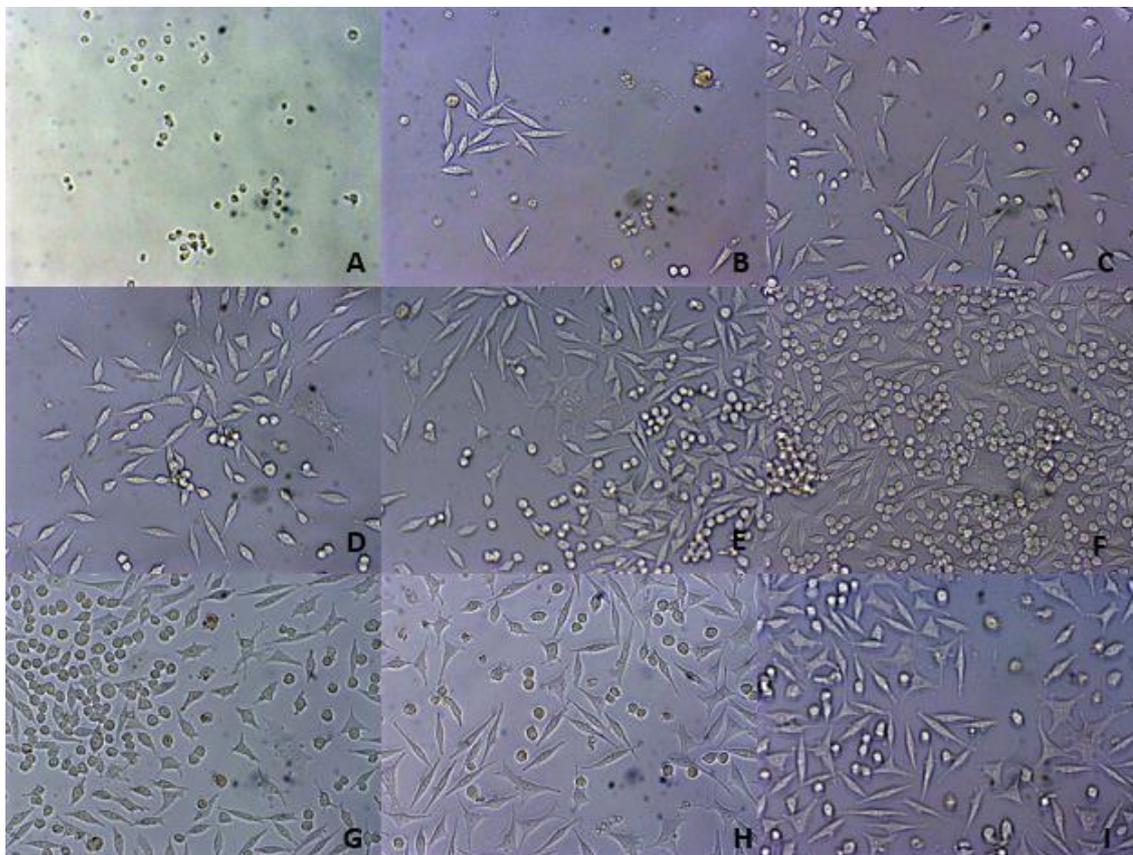


Figura 6: Fotomicrografias das culturas de macrófagos RAW 269.7, após 48 horas de tratamento com diferentes concentrações do OEF de *C. blanchetianus* Baill, feitas em microscópio invertido de fase (Nikon Eclipse TS 100), 100x; A: 1000; B: 500; C: 100; D: 50; E: 10; F: 5; G: 1  $\mu\text{g.mL}^{-1}$ ; H: DMEM; I: Solvente (DMEM + álcool 20%).



#### 4. CONCLUSÕES

- Os óleos essenciais da casca (OEC) e da folha (OEF) de *C. blanchetianus* Baill possuem a mesma constituição química, mas no OEF há, proporcionalmente, uma maior quantidade de compostos voláteis. Os principais compostos identificados nesses óleos foram: alfa-pineno, delta-cadineno, beta-pineno e d-limoneno;
- As amostras de OEC e OEF foram efetivas sobre os patógenos orais testados, à exceção do *A. actinomycetencomitans* e do *S. salivarius* que não apresentou CIM para as concentrações testadas;
- Tanto o OEC quanto o OEF foram eficazes na redução da aderência *in vitro* de *F. nucleatum*, indicando que podem ser utilizados com em uma possível formulação fitoterápica antibiofilme;

- As amostras de OEC foram menos citotóxicas do que OEF, e na concentração de  $50 \mu\text{g.mL}^{-1}$  permitiram a viabilidade de 98,63% ( $\pm 9,02$ ) dos macrófagos.

## REFERÊNCIAS

---

Adams RP. Identificación of essential oil components by gas chromatography/Mass spectrometry. 4ª Ed. Carol Stream: Allured Publishing Corporation, 2007.

Ammann TW, Belibasakis GN, Thurnheer T. Impact of early colonizers on in vitro subgingival biofilm formation. PLoS One 2013; 8(12): e83090.

American Dental Association, Council on Scientific Affairs : Combating antibiotic resistance. J Am Dent Assoc 2004; 135:484.

Angelopoulou, D.; Demetzos, C.; Perdetzoglou, D. Diurnal and seasonal variation of the essential oil labdanes and clerodanes from *Cistus monspeliensis* L. leaves. Biochem Syst Ecol 2002; 30: 186-189.

Bilia AR, Santomauro F, Sacco C, Bergonzi MC, Donato R. Essential Oil of *Artemisia annua* L.: An Extraordinary Component with Numerous Antimicrobial Properties. Evid Based Complement Alternat Med 2014; 2014: 159819. doi: 10.1155/2014/159819.

Chaves SAM, Reinhard K.J. Palespharmacology and Pollen: Theory, Method, and Application. Memoirs Inst Oswaldo Cruz 2003; 98: 207–11.

CLSI, *Clinical and Laboratory Standards Institute*. Metodologia dos Testes de Sensibilidade a Agentes Antimicrobianos por Diluição para Bactéria de Crescimento Aeróbico, 2005.

CLSI, *Clinical and Laboratory Standards Institute*. Metodologia dos Testes de Sensibilidade a Agentes Antimicrobianos por Diluição para Bactéria de Crescimento Anaeróbico, 2008.

Dorman HJD, Deans SG. Antimicrobial agents from plants: antibacterial activity of plant volatile oils. J Appl Microbiol 2000; 88: 308-316.

Dourado RCM, Silveira ER. Preliminary investigation on the volatile constituents of *Croton sonderianus* Muell. Arg.: Habitat, plant part and harvest time variation. J Essent Oil Res 2005; 17:36-40.

Fine DH, Markowitz K, Furgang D, Goldsmith D, Nittel-ricci D, Charles CH. et al. Effect of rinsing with an essential oil-containing mouthrinse on subgingival periodontopathogens. *J Periodontol* 2007; 78(10):1935-42.

França A, Cardoso-Teixeira AC, Medeiros TC, Quinto-Farias Mdo S, Sampaio CM, Coelho-de-Souza AN, Lahlou S, Leal-Cardoso JH. Essential oil of *Croton argyrophylloides*: toxicological aspects and vasorelaxant activity in rats. *Nat Prod Commun* 2012; 7(10): 1397-400.

Guggenheim B, Giertsen W, Schupbach P, Shapiro S. Validation of an in vitro biofilm model of supragingival plaque. *J Dent Res* 2001; 80(1): 363–70.

Hosry L. et al. In vitro cytotoxic and anticlastogenic activities of saxifragifolin B and cyclamin isolated from *Cyclamen persicum* and *Cyclamen libanoticum*. *Pharm Bio* 2014; 52(9): 1134-1140.

Islam B, Khan SN, Naeem A, Sharma V, Khan AU. Novel effect of plant lectins on the inhibition of *Streptococcus mutans* biofilm formation on saliva-coated surface. *J Appl Microbiol* 2009; 106: 1682–1689.

Jagannathan R, Lavu V, Rao SR. Comparison of the Proportion of Non-Classic (CD14+CD16+) Monocytes/Macrophages in Peripheral Blood and Gingiva of Healthy Individuals and Patients With Chronic Periodontitis. *J Periodontol* 2014; 85(6) :852-8.

Koyama S, Yamagushi Y, Tanaka S, Motoyashima J. A new substance (yoshixol) with an interesting antibiotic mechanism from wood of oil Japanese traditional tree (kisohinoki), *Chamaecipariis obtuse*. *General Pharmacol* 1997; 28: 797-804.

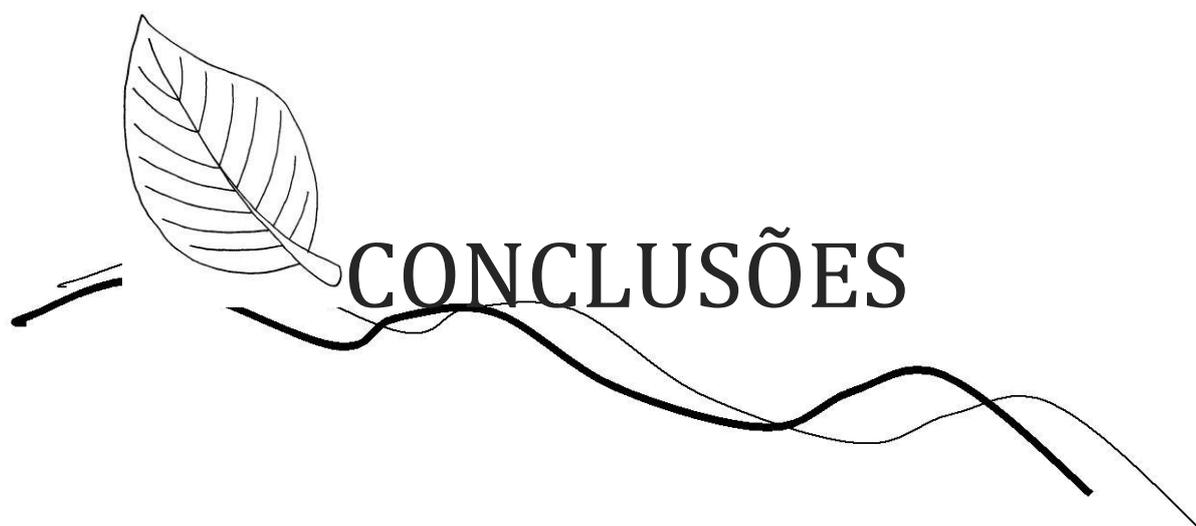
McChesney JD, Clark AM, Silveira ER. Antimicrobial diterpenes of *Croton sonderianus*, 1. Hardwickic and 3,4-secotrachylobanoic acids. *J Nat Prod* 1991; 54(6):1625-1633.

Metzger Z, Blasbalg J, Dotan M, Tsesis I, Weiss EI. Characterization of Coaggregation of *Fusobacterium nucleatum* PK1594 with Six *Porphyromonas gingivalis* Strains. *J Endod* 2009; 35(1): 50-54.

Okahashi N, Nakata M, Sakurai A, Terao Y, Hoshino T, et al. Pili of oral *Streptococcus sanguinis* bind to fibronectin and contribute to cell adhesion. *Biochem Biophys Res Commun* 2010; 391: 1192–1196

Pathirana RD, O'Brien-Simpson RN, Reynolds EC. Host immune response to *Porphyromonas gingivalis* antigens. *Periodontol* 2000 2010; 52(1): 218-237.

- Perez-amador MC, Monroy MA, Bustamante G. Essential oil in leaves of *Croton pseudoniveus* & *C. suberosus* (Euphorbiaceae) species. *Phyton* 2003; 53:109-112.
- Randau KP, Florêncio DC, Ferreira CP, Xavier HS. Estudo Farmacognóstico de *Croton rhamnifolius* H.B.K. e *Croton rhamnifolioides* pax & hoffm. (Euphorbiaceae). *Rev Bras Farmcog* 2004; 14:89-96.
- Schwob I, Bessiere JM, Masotti V, Viano J. Changes in essential oil composition in Saint John's wort (*Hypericum perforatum* L.) aerial parts during its phenological cycle. *Biochem Syst Ecol* 2004; 32: 735–745.
- Seymour R. Additional properties and uses of essential oils. *J Clin Periodontol* 2003; 30(Suppl 5): 19-21.
- Silva AC, Lopes PM, de Azevedo MM, Costa DC, Alviano CS, Alviano DS. Biological activities of  $\alpha$ -pinene and  $\beta$ -pinene enantiomers. *Molecules* 2012; 17(6): 6305-6316.
- Stepanovic S, Vukovic D, Dakic I, Savic B, Svabic-Vlahovic M. A modified microtiterplate test for quantification of staphylococcal biofilm formation. *J Microbiol Methods* 2000; 40(2): 175-179.
- Suárez AI, Vásquez LJ, Manzano MA, Compagnone RS. Essential oil composition of *Croton cuneatus* and *Croton malambo* growing in Venezuela. *Flavour Frag J* 2005; 20: 611-614.
- Tadtong S, Watthanachaiyingcharoen R, Kamkaen N. Antimicrobial constituents and synergism effect of the essential oils from *Cymbopogon citratus* and *Alpinia galanga*. *Nat Prod Commun.* 2014; 9(2): 277-80.
- Torres MCM. Estudo Químico e Biológico de *Croton regelianus* Var. *matosii* (Euphorbiaceae). 2008. 8p. Dissertação (Mestrado em Química Orgânica). Universidade Federal do Ceará.
- Tribble GD, Lamon RJ. Bacterial invasion of epithelial cells and spreading in periodontal tissue. *Periodontol* 2000 2010; 52(1): 68-83.
- Türkez H, Aydin E. In vitro assessment of cytogenetic and oxidative effects of  $\alpha$ -pinene. *Toxicol Ind Health.* 2013 Sep 30.
- Vázquez-Flota F, Carrilo-Pech M, Minero-Garcia Y, Miranda-Ham ML. *Plant Physiol Biochem* 2004; 42: 620-623.
- Zheng Z, Wu M. Cadmium treatment enhances the production of alkaloid secondary metabolites of *Catharanthus roseus*. *Plant Sci* 2004; 166: 507-514.



## CONCLUSÕES

---

Considerando os extratos (ENM, ELU, ELT e ELM) e óleos essenciais (OEC e OEF) de *Croton blanchetianus* Baill obtidos a partir das metodologias empregadas verificou-se que:

- O planejamento experimental foi fundamental na triagem da atividade antimicrobiana de extratos hidroalcoólicos de *C. blanchetianus* Baill, apontando que o extrato com maior efetividade antibacteriana frente a *Streptococcus* sp, foi obtido por turbólise, na concentração vegetal de  $0,14 \text{ mg.ml}^{-1}$  e na proporção álcool:água de 70%;
- O extrato nebulizado (ENM) de *C. blanchetianus* Baill foi o que apresentou maior efetividade antibacteriana sobre periodontopatógenos, dentre todas as amostras avaliadas neste estudo, apresentando CIM de  $15,6 \text{ } \mu\text{g.ml}^{-1}$  sobre todos os periodontopatógenos;
- O ENM também foi o mais efetivo na atividade antibiofilme, e quando utilizado na concentração de  $31,2 \text{ } \mu\text{g.ml}^{-1}$  apenas 4,1% das cepas de *F. nucleatum* permaneceram aderidas às placas de poliestireno;
- O ENM foi a amostra menos citotóxica, apresentando a concentração de  $100 \text{ } \mu\text{g.ml}^{-1}$  como a maior dose não tóxica às culturas de macrófagos RAW 269.7;
- Como o ENM foi o extrato menos tóxico nos testes *in vitro*, prosseguiu-se com sua análise toxicológica em modelos animais, nos quais foi verificado que não apresentou toxicidade aguda, não induzindo nenhum animal à morte, nem alterações hematológicas, bioquímicas ou histopatológicas, podendo ser considerado um fitoterápico seguro;
- Através de CG-EM, identificou-se que os extratos liofilizados por maceração (ELM), ultrassom (ELU) e turbólise (ELT) possuem os mesmos fitoconstituintes, com grande quantidade de monossacarídeos, mas no ELT a proporção de todos os compostos é menor;

- Os óleos essenciais da casca (OEC) e da folha (OEF) possuem a mesma constituição química, mas no OEF há, proporcionalmente, uma maior quantidade de compostos voláteis. Os principais compostos identificados nesses óleos foram:  $\alpha$ -pineno,  $\gamma$ -cadineno,  $\beta$ -pineno e D-limoneno;
- Na análise térmica das amostras verificou-se uma grande quantidade de picos endotérmicos mal resolvidos e sobrepostos e se observou que o OEC foi a amostra que apresentou maior instabilidade térmica, havendo decomposição de 94,10% de seus constituintes entre 30-79,82°C. Em contrapartida as amostras de ELT e ENM, foram as mais estáveis, iniciando esse processo, respectivamente, nas temperaturas de 98,72°C e 99,67°C.



## PROPOSTAS E PERSPECTIVAS

## PROPOSTAS E PERSPECTIVAS

---

O *C. blanchetianus* Baill tem ampla aplicabilidade biológica e os ensaios realizados *in vitro* apontam que os extratos nebulizado, liofilizados e óleos essenciais dessa planta podem ser utilizados na terapia da doença periodontal. Por isso é necessário:

- Realizar ensaios em modelos animais, com o intuito de induzir a doença periodontal em laboratório, tratando-a com os extratos e óleos caracterizados nesse estudo, para definir qual das amostras propicia melhores resultados clínicos;
- Desenvolver formulações farmacêuticas aplicáveis na periodontia, como dispositivos biodegradáveis intrabolsa periodontal, nos quais as amostras possam ser incorporadas como princípios ativos;
- Realizar ensaios clínicos com as formulações farmacêuticas desenvolvidas a fim de validar o *C. blanchetianus* Baill como um potente fitoterápico no tratamento da doença periodontal.