



**UNIVERSIDADE ESTADUAL DA PARAÍBA
PRÓ-REITORIA DE PÓS-GRADUAÇÃO E PESQUISA
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS**

IBRAHIM VIEIRA ROCHA

**DESENVOLVIMENTO DE UM ENXAGUATÓRIO BUCAL COM EXTRATO
NEBULIZADO DE *Guapira graciliflora* (L.)**

CAMPINA GRANDE – PB

2017

IBRAHIM VIEIRA ROCHA

**DESENVOLVIMENTO DE UM ENXAGUATÓRIO BUCAL COM EXTRATO
NEBULIZADO DE *Guapira graciliflora* (L.)**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciência Farmacêuticas da Universidade Estadual da Paraíba em cumprimento às exigências para obtenção do título de mestre.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Dilma Maria de Brito Trovão

Co-Orientadora: Prof^a. Dr^a. Ana Claudia Dantas de Medeiros

CAMPINA GRANDE
2017

É expressamente proibido 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 do trabalho.

R672d Rocha, Ibrahim Vieira.

Desenvolvimento de um enxaguatório bucal com extrato nebulizado de *Guapira graciliflora* (L.) [manuscrito] / Ibrahim Viera Rocha. - 2017.

96 p. : il. color.

Digitado.

Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) - Universidade Estadual da Paraíba, Centro de Ciências Biológicas e da Saúde, 2017.

"Orientação : Profa. Dra. Dilma Maria de Brito Trovão, Departamento de Ciências Biológicas."

"Co-Orientação: Profa. Dra. Ana Claudia Dantas de Medeiros, Departamento de Farmácia".

1. João-mole. 2. Enxaguatório bucal. 3. Plantas medicinais. 4. Atividade antimicrobiana..

21. ed. CDD 615.321

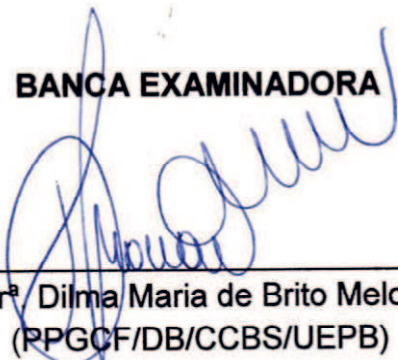
IBRAHIM VIEIRA ROCHA

**DESENVOLVIMENTO DE UM ENXAGUATÓRIO BUCAL COM EXTRATO
LIOFILIZADO DE *Guapira graciliflora* (L.)**

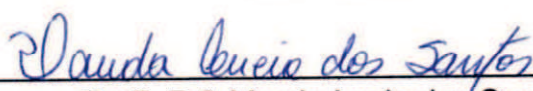
Dissertação apresentada ao Programa de PósGraduação em Ciência Farmacêuticas da Universidade Estadual da Paraíba em cumprimento às exigências para obtenção do título de mestre

Aprovado em 21/02/2017.

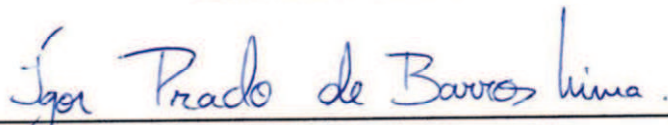
BANCA EXAMINADORA



Profª. Drª Dilma Maria de Brito Melo Trovão
(PPGCF/DB/CCBS/UEPB)
Orientadora



Profª. Drª. Vanda Lucia dos Santos
(PPGCF/DF/CCBS/UEPB)
Examinador interno



Profº. Dr. Igor Prado de Barros Lima
(Avaliador Externo – Faculdade Maurício de Nassau – CG)

À Deus, pela graça de me dar a vida e da conclusão desta pós-graduação, e por sua infinita misericórdia em toda a minha trajetória.

AGRADECIMENTOS

A Deus, por ter me concedido a vida, por me dar discernimento e determinação na busca dos meus objetivos e da realização dos meus sonhos.

A minha família, por acreditar na minha capacidade, me estimular e me proporcionar um bom estudo.

A minha orientadora, Professora Doutora Dilma Maria de Brito Melo Trovão, pela oportunidade de aprendizado, por sua dedicação, confiança, paciência, incentivo, ensinamentos e pela amizade construída durante o desenvolvimento desta pesquisa.

A minha co-orientadora, Professora Doutora Ana Cláudia Dantas de Medeiros, pela paciência, apoio, incentivo, ensinamentos e amizade construída durante a realização deste trabalho e na vida acadêmica.

A técnica de laboratório Airlla pela paciência e troca de ensinamentos durante a execução desta pesquisa.

Aos companheiros da turma de mestrado 2015, foi gratificante trocar experiências.

Ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas (PPGCF) da Universidade Estadual da Paraíba – UEPB, pela oportunidade de crescimento intelectual e profissional. Aos professores, por todo o conhecimento compartilhado e por todo o carinho e respeito.

A Professora Doutora Edja Maria Melo de Brito Costa, do Departamento de Odontologia da UEPB, pela paciência, ensinamentos e sua amizade, e por acima de tudo, ser uma forte colaboradora desta pesquisa juntamente com a Mestre Carolina Medeiros de Almeida. Que Deus derrame bênçãos em suas vidas!

Ao Centro Pluridisciplinar de Pesquisas Químicas, Biológicas e Agrícolas (CPQBA- UNICAMP) pela realização da análise fitoquímica. Obrigado pela disponibilidade das Professoras Mary Ann Foglio, Ana Lúcia Tasca Góis Ruiz, e Marta Cristina Teixeira Duarte e toda sua equipe.

Aos Professores Doutores Igor Prado de Barros Lima e Vanda Lucia pela participação na banca de qualificação e de defesa desta dissertação, pelo incentivo à pesquisa e pela contribuição depositada no trabalho.

*"Tudo posso naquele que me fortalece,
nada e ninguém no mundo vai me fazer
desistir".*

Pe. Fábio de Melo

RESUMO

As plantas têm sido uma rica fonte de agentes medicinais, servindo de alicerce para a síntese de fármacos, e tornando a Caatinga, como os demais biomas, um valioso celeiro para a descoberta de novos agentes antimicrobianos, valorizando o conhecimento etnobotânico e a sua fitogeografia. *Guapira graciliflora* Lundell pertencente à família Nyctaginaceae é conhecida popularmente como João-mole e tem se mostrado um forte candidato com ação antimicrobiana. Este trabalho teve como objetivo desenvolver uma nova formulação de enxaguatório bucal a partir do extrato nebulizado de *G. graciliflora* Lundell, com o intuito de diminuir e controlar o biofilme dentário. O extrato obtido por aspersão foi submetido a teste de toxicidade em *Artemia salina*. Realizou-se screenings fitoquímico e microbiológico do extrato nebulizado de João-mole, para determinação de seus metabolitos secundários e seu composto majoritário, e avaliação, por micodiluição, frente aos microrganismos envolvidos com a formação do biofilme dentário: *Streptococcus mutans*, *Streptococcus salivarius*, *Streptococcus parasanguis* e *Streptococcus oralis*. O screening fitoquímico quantitativo indicou a presença de flavonoides na concentração de 13,89mg mL⁻¹, e taninos 5,96mg mL⁻¹. A identificação do componente majoritário foi realizada através da Espectrometria de Massas com ionização por eletrospray (ESI-MS), sugerindo a presença de pinitol, rutina e kaempferol. *G. graciliflora* Lundell, e a formulação final apresentaram atividade antimicrobiana frente a três das quatro cepas testadas. As análises físico-químicas mostraram que o extrato nebulizado é altamente higroscópico, tem baixa densidade, pH fracamente ácido e perda por dessecação dentro dos parâmetros recomendados pela Farmacopéia Brasileira. Um estudo de préformulação foi realizado com excipientes farmacêuticos e o extrato nebulizado através de Análise Térmica, Espectroscopia com Transformada de Fourier (FT-IR). O estudo de compatibilidade demonstrou que o lauril sulfato de sódio, propilparabeno e sorbitol foram os excipientes eleitos para compor a formulação. Quanto aos lotes produzidos, o pH, viscosidade e as características organolépticas observadas após 24 horas de manipulação e ao término dos testes de estresse térmico e de centrifugação apresentaram estabilidade, representando assim, uma excelente alternativa fitoterápica para a prevenção e controle do biofilme dental.

PALAVRAS-CHAVE: João-mole. Caatinga. Plantas medicinais. Atividade antimicrobiana. Caracterização físico-química

ABSTRACT

The plants have been a rich source of medicinal agents, serving as a foundation for the synthesis of drugs, and making the Caatinga, like the other biomes, a valuable barn for the discovery of new antimicrobial agents, valuing the ethnobotanical knowledge and its phytogeography. *Guapira graciliflora* Lundell belonging to the family Nyctaginaceae is popularly known as João-Mole and has been shown to be a strong candidate with antimicrobial action. This work aimed to develop a new mouthwash formulation from the *G. graciliflora* Lundell nebulized extract, in order to decrease and control the dental biofilm. The extract obtained by spraying was submitted to a toxicity test in *Artemia salina*. Phytochemical and microbiological screenings of the nebulized extract of João-mole, for determination of its secondary metabolites and its major compound, and evaluation by microdilution, against the microorganisms involved with the formation of the dental biofilm: *Streptococcus mutans*, *Streptococcus salivarius*, *Streptococcus parasanguis* and *Streptococcus oralis*. Quantitative phytochemical screening indicated the presence of flavonoids in the concentration of 13.89mg mL⁻¹, and tannins 5.96mg mL⁻¹. Identification of the major component was performed using Mass Spectrometry with electrospray ionization (ESI-MS), suggesting the presence of pinitol, rutin and kaemptonferol. *G. graciliflora* Lundell, and the final formulation showed antimicrobial activity against three of the four strains tested. The physicochemical analyzes showed that the nebulized extract is highly hygroscopic, has low density, poorly acidic pH and loss by desiccation within the parameters recommended by the Brazilian Pharmacopoeia. A preformulation study was performed with pharmaceutical excipients and the nebulized extract through Thermal Analysis, Fourier Transform Spectroscopy (FT-IR). The compatibility study demonstrated that sodium lauryl sulfate, propylparaben and sorbitol were the excipients chosen to make up the formulation. As for the lots produced, the pH, viscosity and organoleptic characteristics observed after 24 hours of manipulation and at the end of thermal stress and centrifugation tests presented stability, thus representing an excellent herbal alternative for the prevention and control of dental biofilm.

KEY WORDS: João-mole. Caatinga. Medicinal plants. Antimicrobial activity. Physical-chemical characterization.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1:	Visão geral da <i>G. graciliflora</i> Lundell (A), das suas folhas (B) e dos seus frutos (C).	18
Figura 2:	Biofilme dentário	20
Figura 3:	Mapa demonstrando o local da coleta do material vegetal, município de Barra de Santana, Semiárido Brasileiro.....	33
Figura 4:	Curva de calibração construída padrão Quercetina (2 – 30 µg/ml) a 415nm.....	52
Figura 5:	Curva de calibração construída com padrão de Catequina (600µg/ml) a 500nm	53
Figura 6:	Espectro ESI(-)–MS obtido do extrato das folhas da <i>G. graciliflora</i> Lundell.....	55
Figura 7:	Espectro ESI(-)–MS/MS obtido para o íon de <i>m/z</i> 193.	55
Figura 8:	Espectro ESI(-)–MS/MS obtido para o íon de <i>m/z</i> 593.	56
Figura 9:	Espectro ESI(-)–MS/MS obtido para o íon de <i>m/z</i> 609.	56
Figura 10:	Espectro ESI(-)–MS/MS obtido para o íon de <i>m/z</i> 1351.	57
Figura 11:	Microscopia óptica do ENGG (200x).....	62
Figura 12:	Difratograma referente ao ENGG.....	63
Figura 13:	Curvas TG (A) e DTA (B) do ENGG.....	65
Figura 14:	Curva DTA do ENGG (verde), excipiente (vermelho) e mistura binária produzida na proporção 1:1 (azul) – curva do propilparabeno.	68
Figura 15:	Curva DTA do ENGG (verde), excipiente (vermelho) e mistura binária produzida na proporção 1:1 (azul) – curva do metilparabeno.....	69
Figura 16:	Curva DTA do ENGG (verde), excipiente (vermelho) e mistura binária produzida na proporção 1:1 (azul) – curva do benzoato de sódio.	70
Figura 17:	Curva DTA do ENGG (verde), excipiente (vermelho) e mistura binária produzida na proporção 1:1 (azul) – curva do polissorbato 80.	71
Figura 18:	Curva DTA do ENGG (verde), excipiente (vermelho) e mistura binária produzida na proporção 1:1 (azul) – curva do lauril sulfato de sódio.....	72
Figura 19:	Curva DTA do extrato ENGG (verde), excipiente (vermelho) e mistura binária produzida na proporção 1:1 (azul) – curva do propilenoglicol.....	73
Figura 20:	Curva DTA do ENGG (verde), excipiente (vermelho) e mistura binária produzida na proporção 1:1 (azul) – curva do sobitol.....	74
Figura 21:	Espectro de Infravermelho referente ao ENGG.	76
Figura 22:	Espectros no infravermelho relativos às misturas 1:1 (azul) do ENGG (verde) com os excipientes farmacêuticos (vermelho): Benzoato de sódio (A), Lauril sulfato de sódio (B) e Propilparabeno (C) e Propilenoglicol (D).	77
Figura 23:	Curva de DTA do enxaguatório bucal	81

LISTA DE QUADROS

Quadro 1: Características físico-químicas dos tensoativos utilizados nos enxaguatórios bucais: Polissorbato 80 e Lauril sulfato de sódio.	23
Quadro 2: Características físico-químicas dos conservantes utilizados nos enxaguatórios bucais: Metilparabeno, Propilparabeno e Benzoato de sódio.	25
Quadro 3: Características físico-químicas dos umectantes utilizados nos enxaguatórios bucais: Propilenoglicol e Sorbitol.	26
Quadro 4: Parâmetros para detecção de Antocianidina, Antocianina e Flavonóides de acordo com protocolo de Matos,1988.....	36
Quadro 5: Parâmetros para detecção de Leucoantocianidinas, Catequinas e Flavonas de acordo com protocolo de Matos,1988.	36

LISTA DE TABELAS

Tabela 1:	Cepas bacterianas utilizadas no Screening Microbiológico	42
Tabela 2:	Classes e concentrações dos adjuvantes utilizados na formulação do enxaguatório bucal.	47
Tabela 3:	Classes de substâncias químicas presentes no extrato de <i>ENGG</i>	50
Tabela 4:	Determinação de Concentração Inibitória Mínima (CIM) e Concentração Bactericida Mínima (CBM) do <i>ENGG</i>	58
Tabela 5:	Percentual de larvas mortas de <i>A. salina</i> em diferentes concentrações do <i>ENGG</i>	60
Tabela 6:	Parâmetros físico-químicos avaliados com o <i>ENGG</i>	63
Tabela 7:	Curva TG do extrato <i>ENGG</i>	65
Tabela 8:	Dados de DTA referentes aos picos do <i>ENGG</i>	67
Tabela 9:	Dados DTA referentes aos processos de transição de fases do <i>ENGG</i> , excipientes e mistura binária produzidas com o <i>ENGG</i> + propilparabeno.	68
Tabela 10:	Dados DTA referentes aos processos de transição de fases do <i>ENGG</i> , excipientes e mistura binária produzidas com o <i>ENGG</i> + metilparabeno.	69
Tabela 11:	Dados DTA referentes aos processos de transição de fases do <i>ENGG</i> , excipientes e mistura binária produzidas com o extrato <i>ENGG</i> + benzoato de sódio.	70
Tabela 12:	Dados DTA referentes aos processos de transição de fases do <i>ENGG</i> , excipientes e mistura binária produzidas com o extrato <i>ENGG</i> + polissorbato 80.	71
Tabela 13:	Dados DTA referentes aos processos de transição de fases do <i>ENGG</i> , excipientes e mistura binária produzidas com o <i>ENGG</i> + lauril sulfato de sódio.	72
Tabela 14:	Dados DTA referentes aos processos de transição de fases do <i>ENGG</i> , excipientes e mistura binária produzidas com o extrato <i>ENGG</i> + propilenoglicol.	74
Tabela 15:	Dados DTA referentes aos processos de transição de fases do <i>ENGG</i> , excipientes e mistura binária produzidas com o <i>ENGG</i> + sorbitol.	75
Tabela 16:	Parâmetros avaliados após 24 horas de formulação do enxaguatório bucal.	79
Tabela 17:	Resultados dos parâmetros avaliados após centrifugação das formulações.	80
Tabela 18:	Resultados dos parâmetros avaliados após estresse térmico.	80
Tabela 19:	Dados DTA referentes aos processos de transição de fases do extrato.	81
Tabela 20:	Determinação de Concentração Inibitória Mínima (CIM) e Concentração Bactericida Mínima (CBM) do enxaguatório bucal.	82

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	14
2	REVISÃO DE LITERATURA.....	16
2.1	CAATINGA.....	16
2.2	<i>Guapira graciliflora Lundell</i>	17
2.3	FITOTERAPIA E A ODONTOLOGIA.....	19
2.4	FORMAS FARMACÊUTICAS DE USO ODONTOLÓGICO	20
2.5	ENXAGUATÓRIO BUCAL.....	21
2.5.1	Excipientes utilizados em enxaguatórios bucais	22
2.6	ESTUDO DE PRÉ-FORMULAÇÃO	26
2.7	CONTROLE DE QUALIDADE EM FITOTERÁPICOS	28
2.8	RESISTÊNCIA MICROBIANA	29
3	OBJETIVOS.....	32
3.1	OBJETIVO GERAL.....	32
3.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	32
4	MATERIAL E MÉTODOS.....	33
4.1	LOCAL DA PESQUISA.....	33
4.2	MATERIAL VEGETAL	33
4.3	PROCESSAMENTO DO MATERIAL VEGETAL	34
4.4	OBTENÇÃO DO EXTRATO	34
4.5	SECAGEM DO EXTRATO	34
4.6	PROSPECÇÃO FITOQUÍMICA	35
4.6.1	<i>Screening</i> fitoquímico qualitativo	35
4.6.2	<i>Screening</i> fitoquímico quantitativo	38
4.6.3	Determinação do marcador fotoquímico do extrato através de Espectrometria de Massas por Electrospray (ESI-MS)	39
4.7	ANÁLISE DOS PARÂMETROS FÍSICO-QUÍMICOS DO EXTRATO	40
4.7.1	Determinação da densidade	40
4.7.2	Determinação da perda por dissecação	40
4.7.3	Determinação do pH.....	41
4.8	ANÁLISE DE CARACTERIZAÇÃO DO EXTRATO NEBULIZADO	41
4.8.1	Difração de Raios-X (DRX).....	41
4.8.2	Microscopia óptica.....	41

.9	SCREENING MICROBIOLÓGICO	41
4.9.1	Cepas Bacterianas	41
4.9.2	Meios de Cultura	42
4.9.3	Preparação do Inóculo Microbiano	42
4.9.4	Ensaio Microbiológico por Microdiluição	43
4.9.5	Determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM)	43
4.9.6	Determinação da Concentração Bactericida Mínima (CBM)	44
4.10	TESTE DE TOXICIDADE	44
4.10.1	Ensaio de Toxicidade em <i>Artemia salina</i>	44
4.11	ESTUDO DE PRÉ-FORMULAÇÃO	45
4.11.1	Obtenção das Misturas Binárias	45
4.12	DESENVOLVIMENTO DO ENXAGUATÓRIO BUCAL	46
4.13	ANÁLISE DOS PARÂMETROS FÍSICO-QUÍMICOS DA FORMULAÇÃO	47
4.13.1	Propriedades Organolépticas	47
4.13.2	Propriedades Físico-Químicas.....	48
4.14	ANÁLISE ESTATÍSTICA	49
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO	50
5.1	PROSPECÇÃO FITOQUÍMICA	50
5.1.1	<i>Screening</i> Fitoquímico Qualitativo	50
5.1.2	<i>Screening</i> Fitoquímico Quantitativo	52
5.1.3	<i>Screening</i> Microbiológico.....	58
5.1.4	Ensaio de Toxicidade em <i>Artemia salina</i>	59
5.1.5	Estudo dos Parâmetros Físico-Químicas do Extrato Nebulizado de <i>Guapira graciliflora Lundell</i>	61
5.1.6	Dimensão da Partícula	61
5.1.7	Determinação da Perda por Dissecação	63
5.1.8	Determinação do pH.....	63
5.1.9	Determinação da Densidade	64
5.1.10	Estudo de Pré-formulação	64
5.1.11	Misturas Fármaco x Excipientes na Proporção 1:1	67
5.1.12	Conservantes	67
5.1.13	Tensoativos	70
5.1.14	Umectantes	73

5.1.15	Perfil Espectroscópico na Região do Infravermelho.....	75
5.1.16	Desenvolvimento do Enxaguatório Bucal	78
5.1.17	Análise Térmica da Formulação Final.....	81
5.1.18	Avaliação da Atividade Antimicrobiana do Enxaguatório Bucal	82
6	CONCLUSÕES	83
7	PROPOSTAS FUTURAS	84
	REFERÊNCIAS	85

1 INTRODUÇÃO

O uso irracional e contínuo de agentes antibacterianos e antifúngicos pode ocasionar a resistência dos microrganismos ou promover o seu crescimento desordenado na cavidade oral. Desta forma, a restrição ao uso de antimicrobianos, a busca por novos agentes com esta propriedade terapêutica e o estudo de mecanismos de resistência, tornam-se temáticas relevantes.

As doenças orais representam um problema de saúde pública, sendo a cárie dental o agravo de saúde bucal mais prevalente nos países em desenvolvimento (HERRERA et al., 2014). Esta condição é oriunda de uma deficiência na higiene oral e do acúmulo do biofilme dentário na superfície dos dentes e na mucosa oral (MARREIRO et al., 2014; CHEON et al., 2013), o que intensifica a resistência microbiana perante aos agentes antibióticos utilizados (MARREIRO et al., 2014; JYOTHI, SESHAGIRI, 2012; VAHABI et al., 2011).

O biofilme dentário é constituído por um aglomerado de microrganismos envolvidos em uma matriz polimérica que se deposita na superfície dental (MARSH, 2010), sendo este um fator de relevância etiológica para doenças odontológicas, periodontais e a cárie. O controle do biofilme ocorre através da remoção mecânica, escovação e o uso de coadjuvantes químicos como os dentífrícios e os enxaguatórios bucais (FREIRES et al., 2010; JOVITO et al., 2009; SOARES et al., 2007).

O uso do enxaguatório bucal é uma forma fácil e prática para controlar e prevenir o crescimento do biofilme dentário, entretanto a sua eficácia estará atrelada a sua composição, sendo de fundamental importância que nessas formulações sejam incorporadas substâncias, naturais ou sintéticas, com ação antimicrobiana (HOFFMANN, 2008). O controle do biofilme dental envolvendo plantas e/ou associações de extratos medicinais resultam em um importante instrumento para a redução de microrganismos orais (COSTA et al., 2009).

Historicamente, as plantas medicinais são instrumentos de cura perante toda a evolução da humanidade, e representam uma excelente fonte de agentes biologicamente ativos. A busca por agentes medicinais naturais com potencial atividade antimicrobiana tem recebido cada dia mais importância nos últimos anos, principalmente na elaboração de produtos destinados à odontologia (DZOYEM, 2013; OLIVEIRA, 2013; ROCHA et al., 2013; VIOLANTE et al., 2012).

Como o Brasil possui um imenso potencial para o desenvolvimento da Fitoterapia, e o Bioma da Caatinga, inserido no semiárido brasileiro, representa uma região de ampla biodiversidade vegetal, que ainda é pouco explorado quanto ao seu potencial farmacológico (ROCHA et al., 2013; SANTOS, 2013). A necessidade de se avaliar este potencial premente compreende não só a importância de descobrir-se novas substâncias a partir de plantas não estudadas, mas também a valorização ecológica dessa região fitogeográfica, pois o conhecimento dessas espécies possibilita a proposição de um plano de gestão para conservação da fitodiversidade existente, através do estímulo a exploração sustentável das plantas onde forem detectadas tais potencialidades (CHAVES et al., 2013; TROVÃO et al., 2004).

Pesquisas têm demonstrado a atividade antimicrobiana *in vitro* de vegetais, da região semiárida brasileira, frente a patógenos cariogênicos (SILVA et al., 2012; SILVA et al., 2010). A *Guapira graciliflora Lundell* conhecida por diversos nomes populares, inclusive por João-mole, tem se mostrado uma forte candidata com ação antimicrobiana (SILVA et al., 2012; SARAIVA et al., 2011).

Considerando os aspectos abordados a hipótese deste trabalho é que a *G. graciliflora Lundell*, pela sua ação antimicrobiana, adequa-se ao desenvolvimento de um enxaguatório bucal o que propiciará a bioprospecção de um novo produto odontológico desenvolvido a partir de plantas medicinais elaborado a partir de uma planta endêmica do semiárido nordestino e também, contribuindo para a conservação do ecossistema em tela, em virtude da possibilidade de exploração econômica sustentável da espécie.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 CAATINGA

A Caatinga é uma vegetação savanizada encontrada predominantemente na região semiárida do Brasil (IBGE, 2004; BRASIL, 2002), representa aproximadamente 11% do território nacional, ocupando uma área equivalente a 844.453 Km², onde a sua maior porção está no nordeste do país, englobando os estados do Ceará, Rio Grande do Norte, a maior parte da Paraíba e Pernambuco, o oeste de Alagoas e Sergipe, a porção norte e o centro da Bahia, o sudoeste do Piauí, abrangendo ainda, a porção norte de Minas Gerais no sudeste brasileiro (PRADO, 2003; DRUMMOND, 2000).

Essa formação vegetacional apresenta um clima semiárido com temperaturas elevadas, intensa luminosidade e possui um regime pluviométrico com precipitações médias inferiores a 750 mm distribuídos de forma irregular (SAMPAIO, 2010; ARAÚJO et al., 2005). Com relação ao relevo, a Caatinga insere-se em formações de planálticas, depressões e planícies, sendo cortada por uma malha hidrográfica onde os rios são intermitentes, que apresentam-se secos em boa parte do ano (CHAVES et al., 2013).

Sabe-se que a Caatinga abriga aproximadamente 178 espécies de mamíferos, 591 de aves, 177 de répteis, 79 espécies de anfíbios, 241 de peixes e 221 abelhas (BRASIL, 2008; BRASIL, 2002). No aspecto vegetal, a sua fitodiversidade é demonstrada pela sua riqueza de agentes com propriedades farmacológicas antimicrobianas, cicatrizantes, antiinflamatórias, antitumoral, que na maior parte dos casos, é relatada apenas sobre o conhecimento farmacoeitnobotânico transferido ao longo dos séculos (CHAVES et al., 2013). O uso de plantas e animais da Caatinga no tratamento de doenças tem sido apontado como um caminho para a descoberta de novos fármacos (KRIEF et al., 2004), sendo uma orientação à avaliação dos metabólitos secundários produzidos e não testados. Tais ações contribuem de forma direta para a conservação de espécies em constante ameaça de extinção (ALVES et al., 2012; ALBUQUERQUE, 2006).

A quantidade de espécies vegetais fanerógamas representa cerca de 5.000 espécies, dentre as quais, 1.512 são restritas à Caatinga e uma média de 318 são endêmicas. Entretanto, a fitodiversidade do semiárido nordestino sofre ameaça

autrópica, que inviabiliza as suas potencialidades a descoberta de novos medicamentos comprometendo a sustentabilidade, contribuindo para a sua desertificação dessa área (GIULIETTI et al., 2006; LEAL et al., 2003; BRASIL, 2002).

Na área científica, diferentes publicações descrevem o bioma da Caatinga como um valioso reservatório para a descoberta de novas substâncias de interesse médico e odontológico (CHAVES, 2013; ROCHA et al., 2013; SILVA et al., 2012; SILVA et al., 2010; ALBUQUERQUE et al., 2007).

Nesse contexto, é primordial a intensificação dos estudos sobre a Caatinga para o entendimento das possibilidades que esta formação vegetacional pode oferecer do ponto de vista científico.

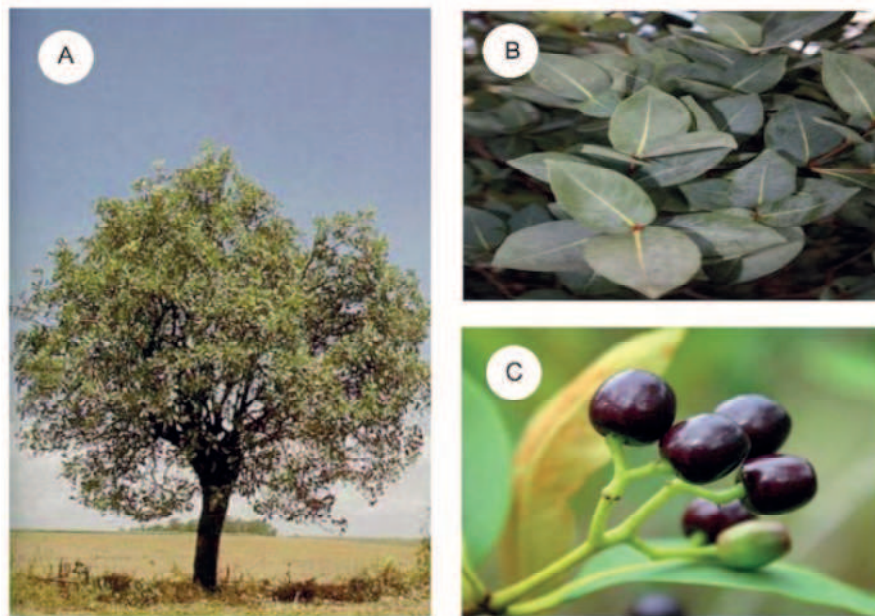
2.2 *Guapira graciliflora* Lundell

Dentre uma variedade de famílias de plantas medicinais destaca-se a *Nyctaginaceae* que apresenta 390 espécies tropicais distribuídas em 30 gêneros (FURLAN, 2008). A denominação da família tem origem no prefixo grego “nyct” que significa “pertencente à noite” e refere-se ao hábito de florescimento noturno de algumas plantas (MORHARDT, MORHARDT, 2004).

No Brasil, a família é representada por aproximadamente dez gêneros e cerca de setenta espécies, com uma distribuição majoritária sobre a Caatinga (FURLAN, 2008), destacando-se o gênero *Guapira* sp., que possui aproximadamente sessenta e oito espécies representantes (CHAVES et al., 2013).

A *G. graciliflora* Lundell, tem como sinonímia científica *Pisonia graciliflora* Mart. Ex J. A. Schimidt; e *Pisonia graciliflora* Mart. Var. *B. subferruginosa*, sendo conhecida popularmente como pau-aranha (COELHO et al., 2005), pau-mole e João-mole, podendo apresentar-se como arbusto, arvoreta ou árvore, atingindo até 8 metros de altura (LORENZI, 1998). As suas folhas são simples, inteiras, opostas, raramente alternas, pecioladas a sésseis, com venação pinada e sem estípulas. As flores são hermafroditas ou unissexuadas, solitárias ou agregadas em inflorescências do tipo cimeira, panícula; fixadas axilar ou terminalmente, com perianto normalmente actinomorfo, tricíclicas (FURLAN et al., 2008; LORENZI, 1998) (Figura 1).

Figura 1: Visão geral da *G. graciliflora* Lundell (A), das suas folhas (B) e dos seus frutos (C).



Fonte: www.google.com

Com relação à distribuição dessa espécie no Brasil, constata-se que a *G. graciliflora* Lundell ocorre no Ceará (ARAÚJO et al., 1999), Paraíba, Bahia, Alagoas, Sergipe, São Paulo, Mato Grosso do Sul (LORENZI, 1998), Maranhão (AQUINO et al., 2007), Tocantins (COELHO et al., 2005), Distrito Federal (FONSECA, SILVA JÚNIOR, 2004), Mato grosso (SILVEIRA et al., 2009; MARIMIN JÚNIOR, HARIDASAN, 2005), Minas Gerais (FURLAN et al., 2008) e Goiás (SILVA, SCARIOT, 2004).

A *G. graciliflora* Lundell possui relevante importância no reino vegetal, tanto por seu valor ecológico, econômico, como também do ponto de vista medicinal. No primeiro aspecto, este vegetal é destinado à recuperação de áreas degradadas. No setor econômico, a madeira é empregada na confecção de equipamentos agrícolas, caixotaria e confecção de brinquedos (AQUINO et al., 2007; LORENZI, 1998). Na área medicinal, é um vegetal que possui uma composição fitoquímica contendo uma ampla variedade de metabólitos secundários. São escassos os estudos sobre o potencial medicinal da *G. graciliflora* Lundell, porém, folhas e cascas da espécie são utilizadas por populares com finalidade terapêutica, como cicatrizante e antimicrobiano (ARAÚJO, 2014; CHAVES et al., 2013; ROCHA et al., 2013). Estudos *in vitro* têm avaliado ações farmacológicas desse vegetal e observou-se que o extrato das folhas possuem propriedade cicatrizante (COELHO et al., 2005),

antitumoral (ARAÚJO, 2014) e antimicrobiana (CHAVES et al., 2013; ROCHA et al., 2013).

2.3 FITOTERAPIA E A ODONTOLOGIA

No Brasil, a utilização de plantas medicinais é bastante difundida, visto que é um país que acumula uma vasta variedade de espécies vegetais, e que em sua grande maioria, é utilizada de forma empírica pela população, sem uma avaliação científica, que adquiriu esse conhecimento através dos povos indígenas ou decorrentes do processo de imigração (europeia, asiática e africana) (CRAGG et al., 2014; ARAÚJO, et al., 2009; COSTA et al., 2009).

O estudo científico das plantas medicinais, levando em consideração o conhecimento popular, fundamenta a Fitoterapia, que representa a prática terapêutica caracterizada pelo uso de agentes medicinais de origem vegetal sob diversas formas de apresentação: chás, sucos, xaropes, compressas, pomadas, sendo diferenciado da alopatia por não possuírem uma composição química definida, isolada, purificada e com estrutura molecular especificada (PERAZZO et al., 2012; CEOLIN et al., 2011; OLIVEIRA et al., 2010; ALMEIDA et al., 2008; FRANÇA et al., 2008; BRASIL, 2006).

A Fitoterapia passou a ser incentivada pelo Ministério da Saúde (MS), e a sua inserção nos serviços públicos de saúde ocorreu através da implementação em 2006 da Política Nacional de Práticas Integrativas e Complementares (PNPIC) no Sistema Único de Saúde – SUS (BRASIL, 2006a), e da Política Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos (BRASIL, 2006b), buscando erradicar o comércio informal, minimizando os riscos à saúde da população, e buscando parâmetros de qualidade para estes medicamentos (CORDEIRO et al., 2006).

A busca por agentes medicinais de origem vegetal apresentou durante os últimos anos, um largo crescimento, devido à procura por novas substâncias que apresentem melhor eficácia, menos efeitos indesejáveis e que possua atividade contra fungos e bactérias (BRITTO et al., 2012; CARELLI et al., 2011).

O uso de fitoterápicos é uma realidade que marca os cuidados com a saúde, porém, referente à saúde bucal, ainda é negligenciada. São raros os produtos destinados à cavidade oral que apresentam um ingrediente ativo de origem vegetal. No âmbito odontológico, estão sendo fortemente estudados a eficácia das plantas

medicinais no tratamento de afecções orais, buscando controlar a formação do biofilme dentário, e assim procurando atuar na prevenção da cárie dentária, doenças da gengiva e candidoses (DINIZ et al., 2010; COSTA et al., 2009; LIMA et al., 2005; DRUMOND et al., 2004; COUTINHO et al., 2004).

O biofilme dentário corresponde a uma população microbiana embebida por uma matriz aglutinante aderida a uma área superficial, sólida e úmida (Figura 2) (LORENZO; 2014; BRIGHENTI et al., 2012), e a sua presença esta intimamente relacionada com o surgimento da cárie dental e outras doenças periodontais (MONFRIM, RIBEIRO, 2010; GEBRAN, GEBERT, 2002), que resultam da aderência inicial de patógenos do grupo *Streptococcus sp.* (cocos Gam-positivos), em especial *Streptococcus mutans* (ISHNAVA et al., 2012), e representam os agravos de saúde bucal mais prevalentes na população mundial (HERRERA et al., 2014).

Figura 2: Biofilme dentário



Diferentes espécies vegetais vem sendo empregadas no tratamento de infecções orais, onde destacam-se o uso de: romã (*Punica granatum L.*), araçá (*Psidium albidum Miq.*), cajueiro (*Anacardium occidentale L.*), alho (*Allium sativum L.*), cravo da Índia (*Syzygium aromaticum L.*), cravo (*Eugenia caryophyllata T.*), calêndula (*Calendula officinalis L.*) e braúna (*Schinopsis brasiliensis Engler*) (SANTOS, 2013).

2.4 FORMAS FARMACÊUTICAS DE USO ODONTOLÓGICO

No tratamento e prevenção de doenças endodônticas podem ser empregados formulações farmacêuticas sólidas, semissólidas e líquidas (DENARDI, 1994).

Dentre as preparações farmacêuticas, as mais utilizadas são dentifrícios (pastas e géis) e enxaguatórios bucais ou colutórios. A forma a ser escolhida necessita dispor de características como compatibilidade adequada com o ingrediente ativo e biodisponibilidade, além de possuir boa aceitação pelo paciente (SANTOS, 2013).

Dentifrícios: são preparações semissólidas que têm como intuito limpar e polir os dentes, conservar as gengivas e remover germes (ALLEN et al., 2013; HOFFMANN, 2008). É uma formulação bem aceita pelos pacientes e compõe um elemento de hábito diário, podendo ser encontrados na forma de gel, pastas e cremes (MEYER, TERA, ETO, 2007).

Pastilhas e gomas de mascar: são formulações sólidas que tem por finalidade liberar o princípio ativo durante a dissolução na região bucal, no caso das pastilhas; ou através da mastigação, no caso da goma de mascar (TORRES et al., 2000).

Enxaguatórios bucais ou colutórios: trata-se de uma formulação líquida que transporta agentes medicinais que atuam no controle e remoção do biofilme dentário (ALLEN et al., 2013; CAVALCANTE et al 2009; MEYER, TERA, ETO, 2007). Essa solução representa um importante veículo, quando associado à escovação dental, na prevenção de doenças periodontais (SANTOS, 2013).

As preparações citadas anteriormente têm como objetivo principal atuar sobre o biofilme dentário. Desta forma, é necessário e importante que os pacientes sigam as instruções e prescrições de um odontólogo, uma vez que o uso incorreto e irracional pode causar desordens na flora microbiana da cavidade oral, como também provocar resistência microbiana (CAVALCANTE et al., 2009).

2.5 ENXAGUATÓRIO BUCAL

Os enxaguatórios bucais ou colutórios são formulações líquidas que apresentam uma associação de substâncias: água, conservantes, surfactantes ou tensoativos, corantes, adoçantes, flavorizantes, e agentes antimicrobianos (CAVALCANTE et al., 2009), que em concordância com a escovação dental e a utilização do fio dental, potencializam a assepsia da cavidade bucal (ZANIN et al., 2007), promovendo a remoção, e impedindo o crescimento desordenado do biofilme oral (FREIRES et al., 2010; ALVES et al., 2009; JOVITO et al., 2009; SOARES et al., 2007).

A utilização dos colutórios foi registrada pela primeira vez em meados do ano de 1.800, e o seu emprego se difundiu ao longo do tempo, pois trata-se de uma solução de fácil uso, que confere refrescância e hálito saudável, possuindo ainda, o poder de alcançar regiões da boca onde a remoção mecânica foi ineficiente (FARIAS et al., 2011; ASADORIAN, 2006; LIMA et al., 2005; JARDIM, JARDIM, 1998).

Os enxaguatórios bucais desempenham uma atividade antimicrobiana sustentada, ou seja, a sua atividade contra microrganismos resulta no rompimento da parede celular bacteriana e inibem as suas atividades enzimáticas. A ação é bactericida e alcançada através da capacidade de adesão na região superficial do tecido a ser tratado, liberando o seu ativo gradualmente (ASADORIAN, 2006; BUGNO, 2006).

Em relação aos requisitos básicos que os enxaguatórios bucais devem possuir, podem ser citados: auxiliar a limpeza, removendo a placa dentária; fornecer um frescor e sabor agradável; ter custo acessível, já que a sua utilização será diária; ser atóxico; possuir estabilidade físico-química durante o seu armazenamento e acondicionamento (SANTOS, 2013; HOFFMANN, 2008).

A formulação de colutórios envolve os seguintes adjuvantes farmacêuticos: umectantes, flavorizantes, preservantes ou conservantes, corantes e solventes (ALLEN et al., 2013), estando associado a um agente antimicrobiano, que pode ser de origem sintética como a clorexidina, triclosan e cetilpiridino, ou de ordem natural como os extratos vegetais (ZANIN et al., 2007; GUNSOLLEY, 2006).

É notório o crescimento de pesquisas científicas, através de estudos *in vitro* e *in vivo*, que buscam desenvolver e avaliar formulações odontológicas fitoterápicas, destinadas a promover uma ação antibacteriana, e que tenha como finalidade dispor a população uma nova forma de tratamento e prevenção de doenças orais relacionadas ao biofilme oral (ZANIN et al., 2007).

2.5.1 Excipientes utilizados em enxaguatórios bucais

➤ *Tensoativos*

São elementos que reduzem a tensão superficial e promove o surgimento de espuma na solução, conferido desta forma, uma melhor ação da formulação na limpeza dos dentes. Os tensoativos devem ser atóxicos e insípidos, além de garantir

a integridade da mucosa oral (ALLEN et al., 2013; APPEL, REUS, 2005).Dentre os agentes tensoativos podemos citar:

- Polisorbato 80 (Tween 80[®]): conhecido também por Atlas E, Montanox 80 e (Z)-sorbitato, é largamente utilizado na Cosmetologia e no desenvolvimento de preparações farmacêuticas orais, e além de ser atóxica, relatos demonstram que o Tween 80[®] pode apresentar toxicidade de intensidade variada; moderada pela via intravenosa, e fraca, quando administrado pela via oral ou oftálmica. Em estudos experimentais com ratos, obteve-se a DL50 por via oral de 25g/kg, e por via intravenosa de 4,4g/kg. O polissorbato 80 possui as características apresentadas no Quadro 1 (ALLEN et al., 2013; ROWE et al., 2009; GIL, BRANDÃO, 2007; PRISTA et al, 1991).
- Lauril sulfato de sódio: conhecido também como sal de sódio; sal de sódio dodecilsulfato e sulfato de lauril. É o tensoativo mais usado nas formulações tópicas e orais, podendo as mesmas ser ácidas ou básicas. Com relação a sua toxicidade, esse adjuvante farmacêutico é considerado moderadamente tóxico para a pele, olhos e a mucosa estomacal e na via intravenosa não é recomendada a sua utilização. A DL50 experimentada em camundongos aponta para a via intravenosa 0,12g/kg e por via oral 1,29g/kg. O lauril sulfato de sódio apresenta as características apresentadas no Quadro 1 (ALLEN et al., 2013; GIL, BRANDÃO, 2007):

Quadro 1: Características físico-químicas dos tensoativos utilizados nos enxagatários bucais: Polissorbato 80 e Lauril sulfato de sódio.

Características físico químicas	Descrição	
	Polissorbato 80	Lauril sulfato de sódio
Fórmula empírica	$C_{64}H_{124}O_{36}$	$C_{12}H_{25}NaO_4S$
Peso molecular	1.310 u.a.	288,38 u.a.
Acidez e alcalinidade	pH = 6,0-8,0, em solução aquosa a 5% (p/v)	pH= 7,0-9,5 em solução aquosa 1% (p/v)
Solubilidade	É solúvel em etanol e água.	Tem afinidade pela água, porém é insolúvel em clorofórmio e éter.
Estabilidade	É estável na presença de ácidos e bases fracas e tendem a saponificação em meio ácido ou básico forte.	Apresenta boa estabilidade em condições ideais de armazenamento e tende a sofrer hidrólise em um meio igual ou inferior a 2,5.

➤ *Conservantes*

São substâncias que proporcionam à formulação proteção contra microrganismos, principalmente se esta preparação possuir um volume maior de água (ALLEN et al., 2013; PRISTA et al, 1991). A concentração usual pode variar entre 0,05% a 2,0% (APPEL, REUS, 2005). Podem ser citados como agentes conservantes:

- Metilparabeno: é um preservante conhecido também como Nipagin M, Metil parasept, éster metílico. É empregado no preparo de medicamentos e cosméticos, além de estar presente na produção de alimentos. No passado, esse excipiente farmacêutico foi empregado em fórmulas oftálmicas e injetáveis, mas caiu em desuso por possuir uma ação irritativa. Estudos com cães definem que a DL50 por via oral é de 30g/kg e em camundongos, por via intraperitoneal sua DL50 é 0,96g/kg. O metilparabeno apresenta as características apresentadas no Quadro 2 (ROWE et al., 2009; PRISTA et al, 1991).
- Propilparabeno: é um conservante conhecido também por Nipazol M; propagyn; propyl aseptoform, que pode ser aplicado na área alimentícia, de cosméticos e em formulações farmacêuticas. A Organização Mundial de Saúde (OMS) estabelece que a ingestão diária não deve ultrapassar 10mg/kg de peso corporal. A DL50 obtida por estudo em modelos animais, estabelece que por via oral é 6,33g/kg e intraperitoneal de 0,2g/kg. Esse adjuvante apresenta as características apresentadas no Quadro 2 (ALLEN et al., 2013; GIL, BRANDÃO, 2007).
- Benzoato de sódio: é um adjuvante farmacêutico conhecido também por sal sódico de ácido benzoico, natrium benzoicum e ácido benzoico de sódio. É empregado como lubrificante na produção de comprimidos, e a sua utilização de maior relevância é na forma de conservante antimicrobiano em composições farmacêuticas, alimentícias ou de cosméticos. A sua toxicidade é semelhante aos dos derivados do ácido salicílico; podendo causar irritação gástrica, hemorragias, urticária e anafilaxia. A DL50 determinada em ratos, estabelece que, por via intravenosa é 1,4g/kg; por via intramuscular é 2,3g/kg e por via oral esta entre a faixa de 1,6 a 4,1g/kg. Esse excipiente farmacêutico possui as características apresentadas no Quadro 2 (ALLEN et al., 2013; GIL, BRANDÃO, 2007; PRISTA et al, 1991).

Quadro 2: Características físico-químicas dos conservantes utilizados nos enxaguatórios bucais: Metilparabeno, Propilparabeno e Benzoato de sódio.

Características físico químicas	Descrição		
	Metilparabeno	Propilparabeno	Benzoato de sódio
Fórmula empírica	$C_8H_8O_3$	$C_{10}H_{12}O_3$	$C_7H_5NaO_2$
Peso molecular	152,15u.a.	180, 20 u.a.	144,11 u.a.
Densidade	1,352g/cm ³	0,426g/cm ³	1,497-1,527g/cm ³
Acidez e alcalinidade	pH ente 3,0 e 9,0	pH ente 3,0 e 9,0	pH igual a 8,0
Solubilidade	É solúvel em água, glicerina, metanol, etanol e éter.	É solúvel em água, propilenoglicol, etanol, glicerina, óleo mineral, óleo de amendoim.	É solúvel em água e etanol.
Estabilidade	Possui estabilidade em solução aquosa de pH entre 3,0 a 6,0; e em pH superior a 8, tende a sofrer reação de hidrólise.	É estável em solução aquosa de pH entre 3,0 a 6,0; e em pH superior a 8, tende a sofrer hidrólise.	É estável em solução aquosas e etanólicas

➤ *Umectantes*

São adjuvantes farmacêuticos atóxicos, cujos seus representantes possuem viscosidades diferentes, e atuam melhorando a solubilização dos demais componentes envolvidos na formulação, melhorando dessa forma a manipulação de formulações. Nos enxaguatórios bucais, a quantidade de umectantes é mínima visto que nessa formulação encontramos uma maior quantidade de água para que essa formulação apresente uma viscosidade que não venha a causar erosões na superfície dental (APPEL, REUS, 2005; LIMA et al., 2005). Pode-se citar como agente umectante:

- Propilenoglicol: conhecido por também por 1,2-di-hidroxiopropano; propano-1,2-diol, trata-se de um líquido relativamente atóxico empregado na indústria do tabaco, cosmética, alimentícia e farmacêutica. Quando em membranas e mucosas, em caráter oclusivo, esse glicol pode ocasionar irritação local. A OMS aponta que a dose diária por peso corporal deve permanecer em torno de 25mg/kg, enquanto que a DL50 determinada para a via oral em ratos é de 22g/kg e por via intravenosa reduz para 6,63 g/kg. O propilenoglicol apresenta os caracteres físico-químicos apontados no Quadro 3 (ALLEN et al., 2013; GIL, BRANDÃO, 2007; PRISTA et al., 1991).

- Sorbitol: é conhecido por D-manitol, Maná açúcar e Mannite, sendo detectado em frutas comestíveis e amplamente utilizado na composição de formulações odontológicas, pois é atóxico, não cariogênico, e incapaz de interferir na integridade da mucosa oral. A DL50 por via oral obtida em ratos é de 17,8g/kg. (ALLEN et al., 2013; GIL, BRANDÃO, 2007; PRISTA et al., 1991). As suas características são apontadas no Quadro 3.

Quadro 3: Características físico-químicas dos umectantes utilizados nos enxaguatórios bucais: Propilenoglicol e Sorbitol.

Características físico químicas	Descrição	
	Propilenoglicol	Sorbitol
Fórmula empírica	$C_3H_8O_2$	$C_6H_{14}O_6$
Peso molecular	76,09 u.a.	182,17 u.a.
Densidade	1,038 a 20 °C	0,430 g/cm ³
Ponto de fusão	-	166-168°C
Acidez e alcalinidade	pH igual a 9	pH entre 5,5 e 7,0
Solubilidade	É miscível em água, ésteres, cetona e álcoois	É miscível em água, álcoois e glicerina, sendo insolúvel em éter
Estabilidade	É estável em baixas temperaturas, e sofre reações oxidativas em temperaturas elevadas	É estável na forma de soluções ou no estado seco

2.6 ESTUDO DE PRÉ-FORMULAÇÃO

O estudo de pré-formulação engloba desde o momento em que uma substância tem sua atividade biológica comprovada até o desenvolvimento de uma forma farmacêutica segura, eficaz e estável (ALLEN et al., 2013; BORCHARDT, 1998; PRISTA et al, 1991). É um processo farmacêutico que envolve uma sequência de estudos físico-químicos, que fornecem um conhecimento prévio do princípio ativo e seus excipientes, além de descrever, mesmo em caráter discreto, modificações de ordem física e química em uma formulação (ALLEN et al., 2013; SANTOS, 2013). Trata-se de um estudo que tem por finalidade identificar possíveis transtornos que sejam motivados pela presença de adjuvantes, que esteja relacionado com o processo de manipulação ou fabricação, ou a sua estabilidade (NIAZI, 2007; BORCHARDT, 1998).

Sobre o estudo de pré-formulação é importante salientar que o mesmo é composto por etapas sequenciadas: caracterização do princípio ativo através de parâmetros como a solubilidade, coeficiente de partição e pKa; estudo de compatibilidade entre fármaco-excipiente, e o estudo de estabilidade da formulação final (ALLEN et al., 2013; LACHMAN, LIEBERMAN, KANING, 2001).

Antes da etapa de formulação, e independente da forma farmacêutica, é essencial que o ingrediente ativo e excipientes sejam analisados quanto a sua compatibilidade. Dado ao fato que os parâmetros físicos e as interações químicas entre fármacos e adjuvantes podem modificar a natureza química, a estabilidade e conseqüentemente, a biodisponibilidade, eficácia terapêutica e segurança (TITA et al., 2011). O estudo de compatibilidade conta ainda com técnicas que proporcionam uma análise mais robusta e criteriosa dos excipientes, onde podemos citar as análises termoanalíticas, a Espectrometria de Infravermelho com Transformada de Fourier (FT-IR), a Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) e a Difração de raios-X (DRX) (LAVOR et al., 2014, AIGNER et al., 2012; CHIENG; RADES; AALTONEN, 2011; CHAVES et al., 2009).

A análise térmica corresponde a um grupo de técnicas analíticas, onde a propriedade física de uma amostra é mensurada em função do tempo ou da temperatura, sob uma atmosfera específica (HAINES, 2002). As técnicas termoanalíticas: Termogravimetria (TG), Análise Térmica Diferencial (DTA) e a Calorimetria Exploratória Diferencial (DSC) (SILVA; PAOLA; MATOS, 2007), possuem uma larga aplicabilidade em uma ampla variedade de estudos, como por exemplo, no desenvolvimento de polímeros e cerâmicas, e de alimentos (OSAWA, 2000). Na área farmacêutica, atuam na caracterização, controle de qualidade, estabilidade, identificação, pureza, determinação de umidade, polimorfismo e cinética de degradação térmica (OLIVEIRA et al., 2011). A análise térmica constitui um forte aliado para a padronização e caracterização de extratos vegetais secos por *spray drier*, podendo ainda, ser instrumento de avaliação de estabilidade e compatibilidade entre constituintes de formulações de origem vegetal (MEDEIROS et al., 2002).

A TG é uma técnica termoanalítica baseada na variação de massa de uma amostra, em função da temperatura, onde a amostra é depositada em uma microbalança contida em um forno. Essa perda pode significar a ocorrência de

vários fenômenos como decomposição, oxidação, desidratação, entre outros (LEIVA et al., 2006; PEREIRA et al., 2009).

A análise de DTA é uma técnica ágil e de simples realização, que fornece evidências de interações entre os componentes avaliados (LAVOR et al., 2014). A técnica tem a capacidade de medir a diferença de temperatura entre a substância a ser analisada e uma amostra referência, sendo ambas submetidas a um programa de temperatura. Nesta técnica é possível observar as mudanças de fase e reações das amostras (BERNAL et al., 2002; MEDEIROS et al., 2002).

A análise de FT-IR é uma técnica de metodologia simples, no entanto, é eficaz na detecção de interações fármaco-excipiente. Trata-se de uma técnica auxiliar na detecção de interações químicas demonstradas por espectros, onde pode-se constatar a redução da sua intensidade, a diminuição ou desaparecimento de bandas de absorvância (MEDEIROS et al., 2002).

A técnica de DRX constitui em um parâmetro que baseia-se na interação física da radiação eletromagnética com a amostra, de forma que venha a demonstrar um arranjo estrutural da amostra (SCAPIN, 2003). A radiação eletromagnética ao incidir na amostra sofrerá um desvio conforme a sua estrutura organizacional. Toda difração é característico de determinadas formas cristalinas, porém, as estruturas amorfas não apresentam um desvio delimitado. Logo, é um parâmetro para analisar o estado organizacional (cristalina ou amorfa) de uma substância, como também detectar modificações ocasionadas pela junção entre os constituintes de uma formulação farmacêutica (OLIVEIRA et al., 2010).

2.7 CONTROLE DE QUALIDADE EM FITOTERÁPICOS

Independente da forma farmacêutica final é indispensável que o fitoterápico seja avaliado quanto a sua qualidade desde a sua origem vegetal até o produto final. A qualidade da formulação estará interligada ao cumprimento de critérios estabelecidos para cada etapa. A Farmacopeia Brasileira propõe monografias com testes analíticos para uma grande variedade de plantas (SOUZA et al., 2010).

Os ensaios analíticos, que podem ser organolépticos ou físico-químicos, tem por objetivo verificar e assegurar que os produtos envolvidos em uma fórmula farmacêutica quanto à preparação acabada, apresentem parâmetros de qualidade pré-estabelecidos (BRASIL, 2008).

Os testes organolépticos averiguam os caracteres gerais dos produtos, tais como cor, sabor, aspecto, sabor e tato, através do sensorial do profissional que executa a análise. Esses ensaios buscam detectar alterações visuais, que possam ocorrer nas preparações farmacêuticas através de turvação, segregação ou formação de precipitados (FARMACOPEIA BRASILEIRA, 2010; GIL, 2010; BRASIL, 2008).

Os ensaios físico-químicos revelam características que são perceptíveis por equipamentos específicos. Por sua vez, os equipamentos envolvidos nessas análises devem estar calibrados para que possam fornecer resultados válidos. Dentre os ensaios físico-químicos podemos citar: potencial hidrogeniônico (pH), viscosidade, teor de cinzas, condutividade, índice de espuma, estabilidade preliminar, dentre outros (FARMACOPEIA BRASILEIRA, 2010; GIL, 2010; BRASIL, 2008).

Não há registro de uma legislação ou norma específica que trate sobre o controle de qualidade de enxaguatórios bucais (BUGNO, 2006), portanto, para a análise desses parâmetros seguem estudos científicos e monografias da Farmacopéia Brasileira.

2.8 RESISTÊNCIA MICROBIANA

O primeiro antibiótico, a penicilina G, foi descoberto em 1929, na Alemanha, por *Sir Alexander Fleming*, e a busca por ativos antimicrobianos prosseguiu, resultando ainda na década de 30, o surgimento de derivados sulfonamídicos, e nos anos seguintes surgiam novas classes de antibióticos (CHOPRA et al., 2002). Em paralelo a fase de descoberta, em relatórios produzidos por *Fleming*, a resistência aos antimicrobianos foi relatada, em virtude de algumas bactérias, inclusive a *Escherichia coli*, apresentarem resistência à penicilina. O período que antecede a descoberta dos antibióticos foi marcado por um panorama onde as infecções bacterianas aterrorizavam gerações, sendo considerada a principal causa de mortes. Ao passo que a antibioticoterapia torna-se um recurso terapêutico importante, surgem cepas resistentes ao referido fármaco, levando a necessidade de busca por novas substâncias (SUMMERS; 2008; GUILFOILE 2007; HOGG, 2004).

Entende-se por resistência a agentes antimicrobianos, a capacidade adquirida de um microrganismo em resistir às ações de um agente quimioterápico no qual era

reconhecidamente sensível. Para algumas classes de antibióticos, teremos uma resistência de forma inata, enquanto que, em espécies sensíveis, há cepas que têm a habilidade de desenvolver ou adquirir resistência (MADIGAN et al., 2003; MIMS et al., 1999).

O desenvolvimento de resistência aos antibióticos ocorre através de mecanismos bioquímicos, que incluem: inativação do antibiótico, através de enzimas específicas, diminuição da permeabilidade ao fármaco, efluxo do antibiótico, por mediação de transporte ativo e alteração do sítio de ligação do antibiótico (MIN et al., 2007).

A resistência microbiana pode ser adquirida por meio de mecanismos genéticos, onde o seu desenvolvimento ocorre devido a mutações genéticas ou através de plasmídeos de resistência. O primeiro mecanismo, tem a sua origem durante o processo de divisão celular, onde nessa etapa, surgem no DNA cromossômico, uma sequência de bases nitrogenadas, estabelecendo assim, uma diferença entre o gene normal e um gene de resistência. Já no segundo mecanismo, a resistência envolve elementos extracromossômicos, podendo um único plasmídeo carrear traços de resistência de diferentes agentes antimicrobianos (DALE, PARK, 2004; MOAT et al., 2002; PRESCOT, et al., 2002).

A transferência de material genético resistente acontece por transformação, conjugação ou transdução. A transformação é um processo de troca de material genético que envolve uma grande variedade de espécies e está relacionada com a absorção de fragmentos de DNA, proveniente da lise de outros microrganismos, e que é transmitido através do líquido que envolve o microrganismo. Se o material genético absorvido possuir um gene resistente, a bactéria poderá incorporá-lo, e assim tornar-se resistente a um antibiótico (GUILFOILE, 2007; MIMS et al., 1999).

A conjugação consiste na transferência de material genético de uma bactéria doadora para outra receptora. Plasmídeos são transferidos, e se os mesmos possuem genes resistentes, farão com que a bactéria receptora adquira suscetibilidade a um antibiótico. A conjugação é o mecanismo de maior relevância para a disseminação de genes resistentes a antibióticos (JAWETZ et al., 1998).

A transdução é o processo de transferência de DNA com mediação de um bacteriófago ou fago que tem sua ocorrência quando plasmídeos ou fragmentos genéticos do hospedeiro são empacotados por engano junto com o material genético do bacteriófago na fase de replicação (JAWETZ et al., 1998).

A seleção de microrganismos resistentes aos antimicrobianos é resultante do uso irracional pela população e no ambiente hospitalar, pelo uso terapêutico ou de profilaxia desses fármacos na clínica médica e odontológica, como também do seu emprego na veterinária, na conservação de alimentos e bebidas, na agricultura e na engorda de animais destinados à alimentação (TAVARES, 2000). Nos Estados Unidos, cerca de 22% dos rios e riachos pesquisados apresentaram níveis detectáveis de antibióticos, o que corrobora com o desenvolvimento de resistência microbiana (KOLPIN, 2002).

O uso indiscriminado de fármacos antimicrobianos por pacientes é um problema comum nos países em desenvolvimento (SANTOS, 2013), porém, os microrganismos multirresistentes são uma preocupação que rompe fronteiras geográficas, gerando transtornos financeiros e sociais, e estabelecendo uma estimativa de 25.000 mortes. Deve-se a resistência microbiana, um aumento significativo dos custos totais para o sistema de saúde, causando um gasto anual com custos hospitalares que alcançam cerca de 1,5 bilhões de euros no continente europeu, e em torno de 35 milhões de dólares nos Estados Unidos (LEUNG et al., 2011).

No Brasil, a ANVISA (Agência Nacional de Vigilância Sanitária) estabelece por meio da RDC Nº 44, de 26 de outubro de 2010, novos critérios ao para a embalagem, rotulagem, dispensação e controle de fármacos antimicrobianos de uso sob prescrição, isoladas ou em associações. A medida do órgão regulador tem por finalidade dificultar o acesso e controlar a prescrição e comercialização desses medicamentos.

Nesse contexto, a busca pelo uso racional dos antimicrobianos em associação com a intensificação pela descoberta de novos agentes antimicrobianos, de origem sintética ou natural, devem ser incentivadas no propósito de combater a ação de patógenos resistentes. É necessário ainda, um olhar especial para o desenvolvimento de formulações fitoterápicas de uso odontológico com propriedades antibacterianas, buscando um anseio da sociedade que deseja a presença de compostos naturais no tratamento e prevenção das patologias bucais.

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Desenvolver uma formulação de enxaguatório bucal a partir do extrato nebulizado de *Guapira graciliflora Lundell*, com a finalidade de que seja utilizado no controle do biofilme dental.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS:

Os objetivos específicos deste trabalho são:

- a) Obter através da técnica de maceração o extrato de *G. graciliflora Lundell*, utilizando como solvente a água purificada e posteriormente, obter o seu extrato nebulizado;
- b) Realizar *screenings* fitoquímico e microbiológico do extrato nebulizado;
- c) Verificar a concentração de metabólitos secundários existentes no material vegetal estudado;
- d) Determinar o seu componente fitoquímico majoritário através de ESI-MS;
- e) Determinar a Concentração Inibitória Mínima (CIM) e a Concentração Bactericida Mínima (CBM) do extrato nebulizado e da formulação desenvolvida;
- f) Realizar um estudo de toxicidade do extrato nebulizado em *A. salina*;
- g) Determinar o perfil térmico e caracterizar as partículas do extrato obtido por aspensão e dos excipientes usados no enxaguatório bucal;
- h) Realizar estudo de pré-formulação nas misturas binárias produzidas com adjuvantes farmacêuticos e o extrato nebulizado, avaliando a sua compatibilidade;
- i) Analisar os parâmetros físico-químicos do extrato nebulizado e da formulação desenvolvida.

4 MATERIAL E MÉTODOS

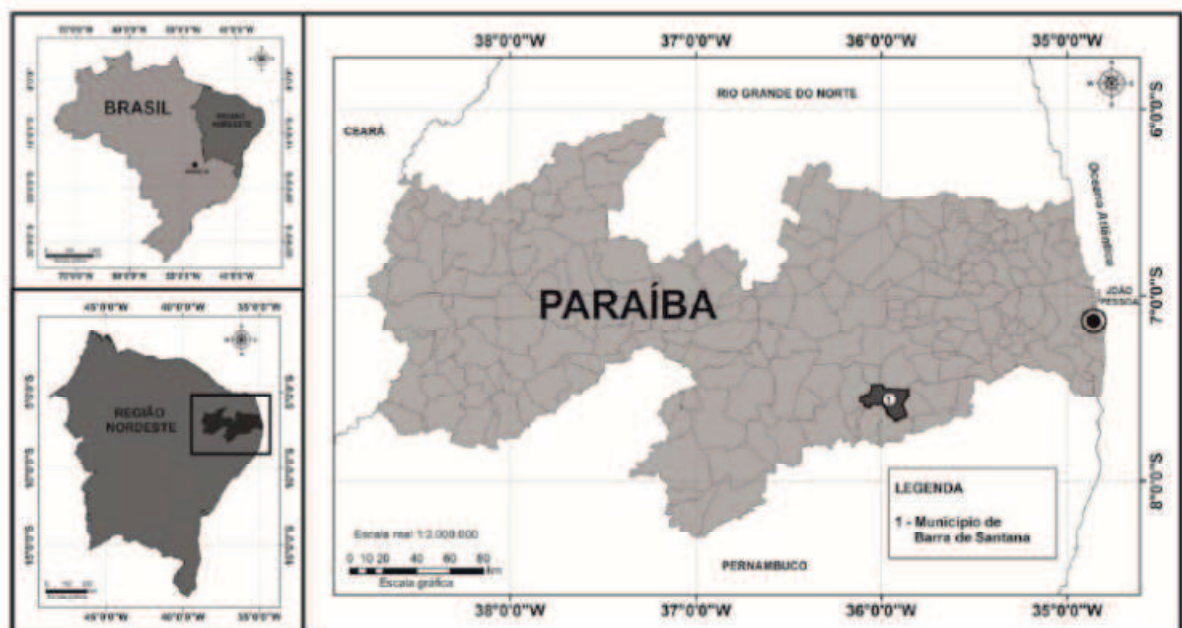
4.1 LOCAL DA PESQUISA

A pesquisa foi realizada no Laboratório de Desenvolvimento e Ensaio de Medicamentos (LABDEM) da Universidade Estadual da Paraíba (UEPB), no Laboratório de Avaliação e Desenvolvimento de BioMateriais do Nordeste - CertBio – Engenharia de Materiais, na Universidade Federal de Campina Grande (UFCG) e no Centro Pluridisciplinar de Pesquisas Químicas, Biológicas e Agrícolas (CPQBA - UNICAMP) em Campinas, São Paulo.

4.2 MATERIAL VEGETAL

O material vegetal, que consistiu de folhas de *G. graciliflora* Lundell (joão-mole), foi obtido a partir de plantas adultas devidamente selecionadas, respeitando o horário e a época ideal para a coleta. A coleta do material botânico foi realizada na Fazenda Vereda Grande (7° 31'12''S, 36° 0' 0'' W), localizada na zona rural do município de Barra de Santana; Paraíba, que encontra-se inserido na área geográfica de abrangência do semiárido brasileiro (Figura 3).

Figura 3: Mapa demonstrando o local da coleta do material vegetal, município de Barra de Santana, Semiárido Brasileiro.



Fonte: Chaves, 2013.

Após a coleta do material vegetal, houve o acondicionamento em invólucros apropriados para o transporte, sendo estes transportados para o LABDEM - UEPB. O espécime testemunho da *G. graciliflora Lundell* encontra-se depositado no Herbário Arruda Câmara (ACAM) da Universidade Estadual da Paraíba (UEPB), no Campus I, Campina Grande, sob o número de registro 907.

4.3 PROCESSAMENTO DO MATERIAL VEGETAL

Cerca de doze quilos do material vegetal colhido passou por um processo de seleção, e posteriormente foram higienizadas em água corrente, contando com o auxílio de uma escova de cerdas macias, para a retirada de contaminantes de sua superfície, como poeira, areia e outras impurezas. As folhas que apresentaram contaminação fúngica foram descartadas.

Após esse processo, as folhas frescas de *G. graciliflora Lundell* foram trituradas manualmente, com a intenção de aumentar a área de contato com o solvente.

4.4 OBTENÇÃO DO EXTRATO

A partir das folhas frescas trituradas de *G. graciliflora Lundell*, aproximadamente 5.950g, foi preparado o extrato, pelo método de maceração, por cinco dias, utilizando uma proporção de 200g de folhas frescas para 1 litro do solvente, conforme preconiza a Farmacopéia Brasileira V edição (2010). O solvente selecionado foi a água purificada, em temperatura ambiente, uma vez que a Associação Brasileira de Odontologia restringe o uso de álcool em enxaguatórios bucais.

Em seguida, o extrato foi acondicionado em frascos de vidro âmbar, hermeticamente fechados, sendo conservados em geladeira, enquanto se inicia o processo de secagem.

4.5 SECAGEM DO EXTRATO

O extrato aquoso foi submetido à nebulização, em um aparelho Spray Drier, da marca LabPlant[®], utilizando como estabilizante farmacotécnico o Aerosil 200[®] na

concentração de 20%, o qual foi calculado em relação à massa teórica final do resíduo. No equipamento, os sistemas de alimentação e atomização são constituídos por uma bomba peristáltica, um atomizador com uma agulha injetora (0,5 mm d.i.) sob pressão. O extrato seco foi segregado por sedimentação na base de um ciclone e a circulação do fluido aquecido nas temperaturas de entrada a 170°C assegurada por um sistema de aspiração. A temperatura de saída variou de 90 a 95°C, sob um fluxo de alimentação de 7,0 mL.min⁻¹.

4.6 PROSPECÇÃO FITOQUIMICA

4.6.1 *Screening* fitoquímico qualitativo

A prospecção fitoquímica dos principais bioativos foi realizada através de reações químicas que apontam a presença dos mesmos através de reações de precipitação, floculação ou coloração, de acordo com os protocolos propostos por Morita e Assumpção (1978), Matos (1988), Costa (2000) e Simões (2004), com modificações.

a) Fenóis

Reagente de Candússio: 1g de ferrocianeto de potássio (C₆N₆FeK₄) foi dissolvido em 100mL de água, sofrendo a adição de amônia (NH₃) na concentração 10 e 20%. Foi empregada também a solução alcoólica de cloreto férrico a 9%. A variação de coloração entre o azul e o vermelho indica a presença de fenóis. Para cada reação, tomou-se um tubo de ensaio com 3mL do extrato sobre o qual adicionou-se três gotas do respectivo reagente.

b) Antocianidina, Antocianina e Flavonóides

Para essa análise, foram adicionados 3mL do extrato em três tubos de ensaios distintos. O primeiro tubo com extrato foi acidulado atingindo um pH entre 1,00 e 3,00; o segundo, sofreu alcalinização a pH 8,50 e o último com pH igual a 11,00. A modificação de coloração do extrato sugere a presença dos metabólitos secundários testados, demonstrados no Quadro 4.

Quadro 4: Parâmetros para detecção de Antocianidina, Antocianina e Flavonóides de acordo com protocolo de Matos,1988.

Constituintes	Cor em meio		
	pH 3 (Ácido)	pH 8,5 (Alcalino)	pH 11 (Alcalino)
Antocianinas e antocianidinas	Vermelha	Lilás	Azul-Púrpura
Flavonas, Flavonóis e Xantonas	-	-	Amarela
Chalconas e Auronas	Vermelha	-	Verm. Púrpura
Flavonóides	-	-	Verm. Laranja

c) Leucoantocianidinas, Catequinas e Flavonas

Para esse teste, foram empregados 3mL de extrato em dois tubos de ensaio, onde um foi acidificado com HCl ,até atingir um pH entre 1,00 e 3,00; e o outro sofreu alcalinização com NaOH até pH 11,00. A reação de coloração sofrida, sugerem a existência dos constituintes descritos no Quadro 5.

Quadro 5: Parâmetros para detecção de Leucoantocianidinas, Catequinas e Flavonas de acordo com protocolo de Matos,1988.

Constituintes	Cor em meio	
	Ácido	Alcalino
Leucoantocianidinas	Vermelho	-
Catequinas (taninos catéquicos)	Pardo amarelada	-
Flavonas	-	Verm. Laranja

d) Flavonóis, Flavononas e Xantonas

Para a demonstração desses constituintes, utilizou-se a solução alcoólica de cloreto férrico a 4,5%. No tubo que contém 3mL do extrato, foi adicionado três gotas do referido reagente. O resultado positivo é comprovado pela mudança de coloração, podendo variar entre verde, amarelo, castanho ou violeta.

e) Taninos

Solução aquosa de FeCl₃ a 1%: preparou-se a solução de cloreto férrico com 1g de cloreto férrico em 100mL de água. A formação de precipitados de coloração

azulada indica taninos pirogálicos (taninos hidrossolúveis) e o tom verde, demonstra os taninos catéquicos (taninos condensados).

Solução alcóolica de FeCl₃ a 9%: 9g de cloreto férrico foram dissolvidos em 50mL de água e HCl 3N. O volume de 100mL foi completado com álcool etílico. Reações de precipitação em tom de azul escuro mostra a presença de taninos pirogálicos, e na cor verde, indica a presença de taninos catéquicos.

Preparou-se dois tubos com 3mL de extrato cada, onde adicionou-se no primeiro tubo três gotas da solução aquosa de FeCl₃ a 1%, e no segundo, adicionou-se três gotas da solução alcóolica de FeCl₃ a 9%, verificando a formação de um precipitado e sua modificação de coloração.

f) Alcaloides

A demonstração desses metabolitos secundários baseou-se na formação de precipitados insolúveis. Nesse teste, foram preparados seis tubos de ensaios com 3mL do extrato, onde em cada tubo foi adicionado um reativo diferente, visando demonstrar a presença de alcaloides, uma vez que o grau de alcanilidade que apresentam é variável, dependendo da disponibilidade do par de elétrons no nitrogênio:

Tubo 1: *Solução de Erdmann:* preparou-se uma solução com 1mL de HNO₃ em 60mL de H₂SO₄ concentrado. A modificação na cor indica a presença de alcaloides.

Tubo 2: *Solução de Marquis:* 4mL de formaldeído a 40% foi misturado com 100mL de H₂SO₄ concentrado. A alteração de coloração demonstra a presença de alcaloides.

Tubo 3: *Reagente de Mayer:* foi preparada a partir de 1,35g de Hg₂Cl₂ e 5g de KI que foram dissolvidos em água e completado até o volume de 100mL. Esse reativo interage com a maioria dos alcaloides em meio ácido, formando precipitação branca.

Tubo 4: *Solução de ácido tânico:* 10g de ácido tânico foram dissolvidos em 12mL de álcool e 80mL de água. A precipitação que indica a presença de alcaloides será de cor amarelada ou esbranquiçada.

Tubo 5: *Reagente de Bouchardat:* 2g de I₂ e 4g de KI foram dissolvidos em 100mL de água. A precipitação castanha indica a presença de alcaloides

Tubo 6: *Reagente de Dragendorff:* para esse teste foram preparadas duas soluções:

Solução A: 8g de BiONO₃.H₂O foram dissolvidos em 20mL de ácido acético

Solução B: 27,2g de KI foram dissolvidos em 50mL de água

A solução A foi adicionada aos poucos na solução B. A formação de precipitado vermelho após a junção dos reativos indica a presença de alcaloides.

4.6.2 Screening fitoquímico quantitativo

➤ *Determinação de flavonoides totais*

A quantificação desse metabólito secundário foi determinado conforme estabelece o método descrito por Meda et al. (2005), com modificações. Primeiramente, foi preparado uma solução metanólica de 5,0 mg/mL do extrato em um balão volumétrico de 10mL. Em uma microplaca de 96 poços (8 linhas A-H/ 12 colunas), foram depositados na linha A, nos poços 1,2 e 3, 200µL do extrato. Na linha B até H foram adicionados 100µL de $AlCl_3$ a 2% em metanol. A microdiluição foi realizada na placa, onde 100µL do conteúdo de cada linha foi homogeneizado e transferido para a seguinte, através de uma pipeta multicanal, repetindo-se este procedimento até a linha H, de modo a se obter concentrações decrescentes do extrato. Os 100µL finais foram desprezados. Na linha A adicionou-se 100 µL do $AlCl_3$ a 2% em metanol. Após dez minutos de repouso, foi realizada a leitura da absorbância a 415nm, contra um branco contendo 100µL de metanol e 100µL de $AlCl_3$.

A curva de calibração foi obtida mediante uma solução padrão a 30µg/mL, preparada pela dissolução de 3mg de Quercetina (Sigma-Aldrich Chemie, Steinheim, Germany) em 100mL de metanol. O total de flavonoides foi determinado através da curva de calibração utilizando quercetina nas concentrações 2, 4, 6, 8, 10, 13, 16, 19, 22, 26, 28 e 30µg/mL e expresso em miligramas equivalente de quercetina. As análises foram realizadas em triplicata.

➤ *Determinação de taninos*

O conteúdo de taninos foi mensurado de acordo com a metodologia descrita por Makkar e Becker (1993), com modificações. Primeiramente, preparou-se 100mL de uma solução de vanilina 4% (p/v), em metanol. Em uma microplaca com 96 poços (8 linhas A-H/12 colunas), foram colocadas na linha A 50µL do extrato e na linha B até H foram depositados 25µL de metanol. Na linha A, nos poços de 1 a 3, foram

colocados 150 μ L de vanilina 4% e nos poços B até H foram adicionados 175 μ L da mesma solução. A microdiluição foi realizada na placa, onde 100 μ L do conteúdo de cada linha foi homogeneizado e transferido para a seguinte, através de uma pipeta multicanal, repetindo-se este procedimento até a linha H, de modo a se obter concentrações decrescentes do extrato. A leitura foi realizada no comprimento de onda de 500nm e a amostra branca consistiu de 150 μ L de vanilina 4%, 25 μ L de metanol e 75 μ L de HCl concentrado.

A curva de calibração foi construída a partir de uma solução-mãe metanólica de catequina 600 μ g/mL. A partir da solução padrão, foram realizadas diluições, de forma a obter soluções de catequina nas concentrações de 10, 50, 100, 200, 300 e 500 e 600 μ g/mL, construindo assim a sua curva de calibração. A concentração desse metabólito secundário foi expressa em miligramas equivalente de catequina. O experimento foi realizado em triplicata.

4.6.3 Determinação do marcador fitoquímico do extrato através de Espectrometria de Massas por Electrospray (ESI-MS)

Cerca de 10mg do extrato nebulizado foi dissolvido em 1mL de água purificada e 10 μ L de cada solução foi diluída em 990 μ L de uma mistura de metanol/água (1:1, v/v), com 0,1% de aditivos auxiliares: ácido fórmico (99%) ou hidróxido de amônio, utilizados para ESI (+) e ESI (-), respectivamente, sendo responsáveis pelo favorecimento de ionização. As amostras foram injetadas por inserção direta no equipamento espectrômetro de massas, modelo 7.2 T LTQ-FT Ultra, Thermo Scientific, Alemanha. O tempo total para aquisição de cada espectro foi estabelecido em um minuto. Os espectros de ESI-MS como também os de ESI-MS/MS foram obtidos nos modos negativo e positivo de ionização. Os espectros de *full scan* foram adquiridos na faixa de m/z 150 a 2000 e os espectros ESI-MS/MS foram obtidos a partir de 50 m/z até um limite acima do íon em estudo e com energia de colisão de 10-40eV. Os dados obtidos foram tratados com o *software* do equipamento (Xcalibur 2.0, Thermo Scientific, Alemanha).

4.7 ANÁLISE DOS PARÂMETROS FÍSICO-QUÍMICOS DO EXTRATO

4.7.1 Determinação da densidade

A densidade do extrato foi calculada conforme o método descrito por Lachman, Lieberman & Kaning (2001), que baseia-se na determinação da densidade utilizando uma proveta de 25mL, previamente pesada. O pó foi transferido até alcançar o volume de 15mL da proveta, eliminando a presença de partículas de ar entre as partículas dos pós, através de batidas sobre uma superfície de madeira. Em seguida, a proveta foi pesada.

A massa do pó foi calculada mediante a diferença de massa entre a proveta cheia e a seca, possibilitando assim o cálculo da densidade pela seguinte expressão:

$$\text{Densidade} = \frac{\text{massa do pó}}{\text{volume da proveta usada}}$$

4.7.2 Determinação da perda por dessecação

Consiste na análise da quantidade de substâncias voláteis de diferente natureza por meio do método descrito na Farmacopéia Brasileira V (2010), onde um cadinho de porcelana foi calcinado durante trinta minutos em estufa da marca Quimis® a 105°C, sofrendo resfriamento em dessecador e pesado 2g do pó. Posteriormente, foi novamente a calcinação por duas horas a 105°C, resfriada e pesada. Essa análise foi repetida até obtenção de peso constante da amostra. O teor de perda por dessecação foi obtido pela equação:

$$\% \text{ de perda por dessecação} = \frac{P_u - P_s}{P_a} \times 100$$

Pa: peso da amostra.

Ps: peso da cápsula contendo a amostra após a dessecação.

Pu: peso de cápsula contendo a amostra antes da dessecação.

4.7.3 Determinação do pH

A determinação do pH demonstra se a amostra tem caráter ácido, básico ou neutro. Para a análise do pH do extrato nebulizado a metodologia adotada foi a descrita na Farmacopéia Brasileira V (2010), onde 0,25g de extrato foi dissolvido em 25mL de água destilada, aquecida em chapa-elétrica (Quimis[®]) e mantida sob ebulição durante cinco minutos. Em seguida, a solução a 1% (p/v) sofreu filtração e resfriamento. A verificação do pH se deu através de um potenciômetro (Gehaka[®]), calibrado com soluções tamponadas de pH 4,00 e 7,00. O resultado obtido foi oriundo da média de três determinações.

4.8 ANÁLISE DE CARACTERIZAÇÃO DO EXTRATO NEBULIZADO

4.8.1 Difração de Raios-X (DRX)

A análise de difração de raios-X foi realizada no equipamento Difratorer 6000 DRX, da marca Shimadzu[®], com varrimento de 10° a 70° (2 θ / min.), na escala 2 θ e radiação de Cu ($K\alpha_1$). A tensão e corrente envolvida na operação do equipamento foi de 40,0 kV e 30,0 mA, respectivamente. Os dados foram tratados com o *software* Origin[®] versão 8.0.

4.8.2 Microscopia óptica

Cerca de 5mg da amostra foi depositada em uma lâmina de vidro e submetido à microscopia óptica (marca Hirox[®], modelo KH – 770), objetivando avaliar as suas características microscópicas.

4.9 SCREENING MICROBIOLÓGICO

4.9.1 Cepas bacterianas

Para a avaliação da atividade antimicrobiana do extrato, foram utilizadas cepas padrão *American Type Culture Collection* (ATCC), conforme demonstra a Tabela 1. As cepas liofilizadas foram disponibilizadas pela Fundação Oswaldo Cruz

(FIOCRUZ – Rio de Janeiro) e a sua reativação, em câmara asséptica, seguiu as recomendações da referida instituição.

Tabela 1: Cepas bacterianas utilizadas no Screening Microbiológico

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

4.9.2 Meios de Cultura

Utilizou-se meios de cultura desidratados, disponíveis no comércio, que foram reconstituídos com água destilada, conforme preconiza o fabricante.

Para a realização dos testes de sensibilidade dos microrganismos ao extrato vegetal e a formulação final foram utilizados, em diferentes etapas, os meios de cultura, ágar *Mueller-Hinton*, da marca HIMEDIA[®], ágar sangue e caldo BHI, da marca HIMEDIA[®].

4.9.3 Preparação do inóculo microbiano

Os microrganismos foram reativados e mantidos em tubos, contendo 10mL de ágar nutriente e incubado em estufa bacteriológica a $37\pm 0,5^{\circ}\text{C}$, por 24 horas, sendo mantidos em câmara de anaerobiose durante o cultivo.

A suspensão de cada microrganismo foi obtida transferindo as culturas crescidas sobre o meio nutriente inclinado, com alça estéril, para uma placa de cultura ágar *Mueller-Hinton* para reativação e após 24 horas, transferido para um tubo de ensaio contendo 3ml de solução salina estéril na concentração de 0,9%.

O inóculo microbiano foi padronizado de acordo com a metodologia descrita na *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI, 2005) e na Farmacopéia Brasileira V edição (2010), em espectrofotômetro BIOESPECTRO[®] sob um comprimento de onda de 625nm, de modo a obter uma concentração final de 10^6 UFC ml⁻¹.

4.9.4 Ensaio Microbiológico por Microdiluição

Em uma microplaca estéril de 96 poços (8 linhas A-H e 12 colunas), foram depositados 100µL do meio de cultura. Posteriormente, foram acrescentados 100µL do extrato no poço correspondente a coluna 1 e linha A na concentração de 4.000µg/mL. A microdiluição foi realizada na placa, onde 100µL do conteúdo do primeiro poço foi homogeneizado e transferido para o seguinte, repetindo-se a operação até a linha H. Os 100µL finais foram desprezados. Em seguida, 10µL do inóculo microbiano a ser testado, de crescimento recente, foram adicionados. As placas foram incubadas por 24 horas a $37\pm 0,5^{\circ}\text{C}$ em atmosfera aeróbia (CLSI, 2008; CLSI, 2009).

O experimento foi realizado em triplicata em três diferentes momentos. O controle do crescimento microbiano e a esterilidade do meio de cultura, bem como, do extrato foram verificados através da análise individualizada nos poços da microplaca. Para o controle positivo, foi utilizado o gluconato de clorexidina a 0,12%, que é considerado o padrão ouro no teste para microrganismos envolvidos com a formação do biofilme dentário.

Com o término do período de incubação, o crescimento microbiano foi indicado pela adição de 20µL da solução de resazurina a 0,01%, da marca Sigma-Aldrich[®], em cada poço e incubado, em temperatura ambiente, por duas horas. A resazurina é uma substância átoxica e de coloração azul não-fluorescente que se torna florescente e rosa quando sofre redução por oxirredutases, nas células microbianas.

4.9.5 Determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM)

A leitura visual foi realizada observando-se a modificação de cor da resazurina. A mudança da coloração azul para rosa fluorescente, aponta a redução do corante e sugere a existência de microrganismos viáveis, enquanto que nos poços onde a cor permaneceu azul, indica inativação microbiana. Dessa forma, pode-se determinar a CIM, ou seja, a menor alíquota do extrato que é capaz de inibir o crescimento dos microrganismos testados.

Na classificação da atividade antimicrobiana do extrato e da formulação foram empregados os parâmetros sugeridos por Holetz et al. (2002), onde: CIM <

100µg/mL - forte atividade; CIM no intervalo de 100 e 500µg/mL - atividade moderada; CIM entre 500 e 1.000µg/mL - fraca atividade e CIM > 1.000µg/mL - ausência de atividade.

4.9.6 Determinação da Concentração Bactericida Mínima (CBM)

Para determinar a CBM, uma alíquota de 50µL de cada poço com concentração igual e superior que a CIM, foram subcultivadas em meio Mueller-Hinton, e incubadas a 37°C por dois dias. As CBM's foram definidas como a menor concentração que inibiu o crescimento visível do microrganismo (CLSI, 2008).

4.10 TESTE DE TOXICIDADE

4.10.1 Ensaio de Toxicidade em *Artemia salina*

Para o teste de toxicidade por *Artemia salina*, utilizou-se a metodologia descrita por Fontenele (1988) e Costa et al, (2010), com modificações. Em torno de 0,3g de ovos de *A. salina* foram cultivados, em uma cuba de vidro, em solução salina composta por 4,75g de bicarbonato de sódio, 1,425g de sulfato de magnésio, 34,2g de cloreto de sódio e 951mL de água destilada, com ajustamento do pH em 9,00, utilizando-se de uma solução de 2mol/L de hidróxido de sódio. O sistema foi iluminado com luz artificial, temperatura ambiente e com saturação de oxigênio até o momento de eclosão das larvas, ou seja, 48 horas após o início do experimento. As larvas de *A. salina* foram distribuídas em tubos de ensaios (dez larvas por tubos), onde cada tubo possuía 10mL de solução de extrato nas concentrações de 100, 50, 25, 12,5 e 6,25µg/mL. O grupo controle foi preparado nas mesmas condições, porém sem a presença do extrato. As culturas de *A. salina* foram incubadas a 25°C, sendo realizada a leitura do número de sobreviventes e mortos após 48 horas. Calculou-se ainda o percentual de mortalidade para cada concentração testada e os seus controles. Foram consideradas larvas mortas todas que não apresentaram nenhum movimento ativo em um período de 20 segundos de observação. O teste foi realizado em triplicata.

4.11 ESTUDO DE PRÉ-FORMULAÇÃO

Para esse estudo, utilizou-se o sistema de misturas binárias, que proporciona esclarecer possíveis incompatibilidades que possam surgir no desenvolvimento da formulação farmacêutica. Dessa forma, foram analisadas misturas binárias entre o extrato nebulizado e os excipientes envolvidos na elaboração de um enxaguatório bucal.

4.11.1 Obtenção das Misturas Binárias

A avaliação de compatibilidade, realizada através da técnica de DTA, entre o ENGG e os adjuvantes farmacêuticos ocorreu através de misturas binárias na proporção 1:1. As misturas empregadas no desenvolvimento do enxaguatório bucal foram preparadas tendo na sua constituição os seguintes agentes conservantes, tensoativos e umectantes:

Extrato nebulizado + propilparabeno

Extrato nebulizado + metilparabeno

Extrato nebulizado + benzoato de sódio

Extrato nebulizado + polissorbato 80

Extrato nebulizado + lauril sulfato de sódio

Extrato nebulizado + propilenoglicol

Extrato nebulizado + sorbitol

➤ *Análise do comportamento térmico do extrato nebulizado e de excipientes usados no enxaguatório bucal*

- Termogravimetria (TG)

A curva termogravimétrica foi obtida pelo equipamento DTG-60 Simultaneous DTA-TG Apparatus, marca Shimadzu®, com razão de aquecimento de 10°C/min até atingir uma temperatura de 900°C, com uma atmosfera de ar de nitrogênio com fluxo constante de 10mL/min. A massa analisada foi de 8,0±2mg, a qual foi depositada em um porta amostra de alumina hermético. Os dados foram analisados através do *software* do equipamento.

- Análise Térmica Diferencial (DTA)

As curvas calorimétricas foram obtidas através do equipamento DTG-60 Simultaneous DTA-TG Apparatus, marca Shimadzu[®], sendo empregado um fluxo de nitrogênio, padrão analítico, de 50 mL/min., como gás de purga da amostra. A programação adotada será de 25 a 450°C, com uma razão de aquecimento de 10°C por minuto. A amostra foi acondicionada em um porta amostra de alumina hermetico, sendo a sua massa de 3,0±1,0mg.

As misturas binárias que apresentaram uma maior susceptibilidade à incompatibilidade foram analisadas por Espectroscopia na Região do Infravermelho (FT-IR). Com a análise desses dados, foram selecionados os adjuvantes farmacêuticos que iriam compor a formulação do enxaguatório bucal.

- Espectroscopia na Região do Infravermelho com Transformada de Fourier (FT-IR)

As amostras analisadas no FT-IR foram realizadas no aparelho Perkin-Elmer 1600, empregando discos de KBr, no intervalo de 4.000 a 400cm⁻¹, buscando avaliar possíveis alterações químicas demonstradas através do surgimento e desaparecimento de bandas.

4.12 DESENVOLVIMENTO DO ENXAGUATÓRIO BUCAL

O desenvolvimento do enxaguatório bucal utilizou a concentração de pó proveniente do extrato nebulizado determinado em 10%, conforme estabelece a Farmacopeia Brasileira V edição (2010). Foram empregados diferentes classes de excipientes com concentrações descritas na Tabela 2. Além do extrato vegetal e dos excipientes, foi utilizado na formulação água purificada, obtida por osmose reversa, em q.s.p. Os excipientes usados foram selecionados a partir do estudo de compatibilidade.

Tabela 2: Classes e concentrações dos adjuvantes utilizados na formulação do enxaguatório bucal.

Classes de excipientes	Concentração (%)
Tensoativo	0,50
Conservante	0.10
Umectante	0,02
Flavorizante	0,01
Água purificada	q.s.p.

O procedimento farmacotécnico consistiu na mistura do extrato nebulizado com o conservante e tensoativo. Em seguida, adicionou-se água suficiente para solubilização destes componentes da mistura. O agente flavorizante foi dissolvido no umectante. Finalmente, foi adicionada a fase solubilizada na água com o umectante (acrescido do aroma) e posteriormente, acrescentou-se água purificada q.s.p. 100mL.

Foram produzidos três lotes da formulação, que foram mantidos em repouso por 24 horas e então submetidos à análise dos seus parâmetros físico-químicos.

4.13 ANÁLISE DOS PARÂMETROS FÍSICO-QUÍMICOS DA FORMULAÇÃO

4.13.1 Propriedades organolépticas

A análise das características organolépticas (aspecto, cor e odor) do enxaguatório bucal foram analisadas em três momentos distintos: após 24 horas de formulada, após o teste de centrifugação e após o teste de estresse térmico, seguindo os parâmetros estabelecidos pela Farmacopeia Brasileira V (edição).

Nas avaliações do aspecto dos produtos, as alterações foram enquadradas como (I) normal, sem alteração; (II) levemente alterado, levemente precipitado ou levemente turvo e (III) separado, precipitado e turvo. As alterações de coloração e odor, foram selecionados os seguintes critérios: (I) normal, sem alteração; (II) levemente modificada; (III) modificada e (IV) intensamente modificada.

4.13.2 Propriedades físico-químicas:

➤ *Determinação do pH*

A determinação do pH dos lotes foram realizadas em três momentos: após 24 horas de formulado, após centrifugação e após estresse térmico. A calibração seguiu as especificações do fabricante e as medições ocorreram em duplicata.

➤ *Viscosidade*

A determinação da viscosidade foi realizada após 24 horas que os lotes foram formulados e acondicionados em temperatura ambiente e logo após os testes de centrifugação e de estresse térmico. O volume analisado em cada ensaio foi de 10mL. As leituras foram realizadas em duplicata, utilizando um viscosímetro AVS – 350, da marca Scott[®], acoplado a um tubo capilar modelo Cannon-Fenske nº150.

➤ *Estresse térmico*

Após 24 horas de formulado, cerca de 10mL de cada lote foi submetido ao efeito do estresse térmico a 40, 50 e 60°C, durante 30 minutos (BRASIL, 2008). Em seguida, foram avaliados os caracteres organolépticos, tais como aparência, odor e cor, além do pH e sua viscosidade.

➤ *Teste de centrifugação*

Após 24 horas que o colutório foi formulado, cerca de 10mL de cada amostra foi submetida à centrifugação, em uma centrífuga de bancada, marca NOVA[®], cujo modelo é NI 1801, durante meia hora a uma rotação de 3.000 rpm (BRASIL, 2008). Posteriormente, foram avaliados os parâmetros organolépticos, tais como cor, odor e aspecto, além do pH e viscosidade.

4.14. ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os resultados obtidos foram avaliados através de média e desvio-padrão calculados no Excel[®] 2010.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 PROSPECÇÃO FITOQUÍMICA

5.1.1 *Screening* Fitoquímico Qualitativo

A busca pelo conhecimento da constituição química de vegetais pertencentes à Caatinga ainda são escassos, e ao passo que a área farmacêutica busca a descoberta de novos bioativos, torna-se fundamental reconhecermos as potencialidades desse bioma. Com esse interesse, pode-se citar os trabalhos desenvolvidos por Chaves et al. (2013), Rocha et al. (2013), Santos (2013), e Souza (2012) que demonstram a fitodiversidade da Caatinga e apontam novos componentes vegetais que possam ser utilizados no desenvolvimento de diferentes formas farmacêuticas.

Os resultados alcançados no *screening* fitoquímico qualitativo do extrato em análise estão apresentados na Tabela 3. Diante do exposto, observa-se que os compostos fenólicos, flavonóides, flavonóis, flavanonas, xantonas, taninos e alcaloides foram detectados no extrato nebulizado de *Guapira graciliflora* Lundell (ENGG).

Tabela 3: Classes de substâncias químicas presentes no extrato de ENGG.

Constituintes Fitoquímicos	<i>G. graciliflora</i>
Taninos	+
Fenóis	+
Antocianidina e Antocianina	-
Flavonóides	+
Leucoantocianidinas, Catequinas e Flavanonas	-
Flavonóis, Flavanonas e Xantonas	+
Saponinas	-
Alcalóides	+

+ (Presença); - (Ausência)

O estudo de prospecção fitoquímica desenvolvido neste trabalho foram concordantes com pesquisas recentes que envolvem a espécie *G. graciliflora* Lundell realizadas por Chaves et al., (2013), Araújo (2014) e Costa et al., (2010), que desenvolveram extrato etanólico (EE), hidroalcolico liofilizado (EOHL) e hidroalcolico (EHA), respectivamente. O primeiro grupo de pesquisadores

demonstraram através de análise qualitativa do *screening* fitoquímico à presença de reações positivas para taninos, compostos fenólicos, flavonoides, flavonóis, flavononas, xantonas, e alcaloides. A segunda equipe de pesquisadores detectaram a presença de metabólitos secundários como: compostos fenólicos e ainda, proteínas e açúcares. A terceira equipe demonstrou reações qualitativas positivas para taninos e flavonoides.

Para a análise desenvolvida neste estudo, não foram demonstrados a presença de antocianidina, antocianina, catequinas, flavonas, leucoantocianidinas e quinonas. O resultado negativo no *screening*, não necessariamente sugere a ausência desses componentes químicos nos vegetais. Tal evento pode ocorrer devido ao solvente empregado na fase de extração, que não seja o mais adequado para as classes de compostos estudados ou a concentração da substância a ser testada esteja presente no material vegetal em baixos índices, inviabilizando sua determinação por mecanismos químicos qualitativos (CHAVES et al., 2013; BOLIGON et al., 2009). A existência desse fenômeno pode ser exemplificada pela análise fitoquímica da *Ucra bacífera* (L.) Gaudich, conhecida por urtiga-brava, que em testes qualitativos para alcaloides totais foram negativos, enquanto que os testes para doseamento desses compostos os detectaram, embora que, em pequenas quantidades (GINDRI et al., 2010).

Investigações fitoquímicas anteriores sobre a família *Nyctaginaceae* demonstraram que certas espécies possuem fitocomponentes em comum com a espécie *G. graciliflora* Lundell, podendo-se indicar a presença de esteroides, terpenóides e flavonoides em *Guapira noxia* (SEVERI, 2007), alcalóides, triterpenos, flavonóides e polifenóis em *Pisonia aculeata* (L.) (PALANIVEL et al., 2008) e flavonoides, taninos e triterpenos, na espécie *Boerhaavia diffusa* Linn.(DARSINI et al., 2009).

Diante do exposto, a família *Nyctaginaceae*, e em especial, a espécie *G. graciliflora* Lendell apresenta uma rica variabilidade de constituintes vegetais que fundamentam a sua utilização popular e gera múltiplas empregabilidades na área farmacêutica, sendo extremamente necessário o aprofundamento de pesquisas fitoquímicas tanto para a sua espécie quanto para outros representantes de sua família.

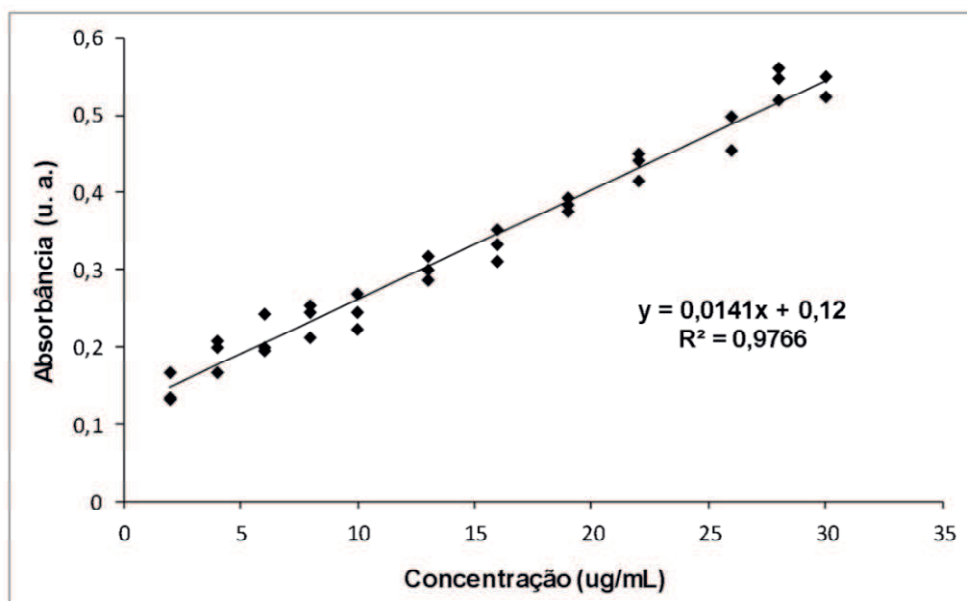
5.1.2 Screening Fitoquímico Quantitativo

➤ Flavonóides Totais

A curva de calibração obtida com Quercetina está representada na figura 4, juntamente com a equação da reta e o coeficiente de relação (R^2). O teor desses flavonoides foi de $13,89 \mu\text{g mL}^{-1}$, comprovando assim a sua determinação qualitativa.

A quantificação de flavonoides totais, envolvendo a mesma espécie vegetal, que também foi coletada, na Fazenda Vereda Grande, obteve uma concentração de $14,52 \mu\text{g mL}^{-1}$ (CHAVES et al., 2013), muito próximo ao valor alcançado neste estudo.

Figura 4: Curva de calibração construída padrão Quercetina (2 – 30 $\mu\text{g/ml}$) a 415nm



Pesquisas realizadas com a família *Nyctaginaceae* ainda são escassas e por esse motivo, ainda há uma dificuldade em estabelecer, quanto ao teor de flavonoides, um comparativo entre a maioria das espécies representantes.

Uma referencia comparativa pode ser estabelecida com estudos que quantificaram o teor de flavonoides encontrados para o extrato de *Mirabilis jalapa* que foi de $65,2 \pm 4,5 \mu\text{g mL}^{-1}$ (HAJJI et al., 2010) e para a *Bougainvillea hybrida*, onde detectou-se um teor de $140,3 \pm 7,8 \mu\text{g mL}^{-1}$ (KAISOON et al., 2011). Logo, tomando como base essas espécies da família *Nyctaginaceae*, verifica-se que a G.

graciliflora Lundell apresentou, neste estudo, menores índices de flavonoides totais do que esses representantes de sua família.

Os flavonoides são metabólitos secundários que exercem diferentes funções fisiológicas nos vegetais, como por exemplo, a proteção contra insetos. É de se destacar que as mudanças ambientais são fatores relevantes para a avaliação dos teores de flavonoides (KOES et al., 2005).

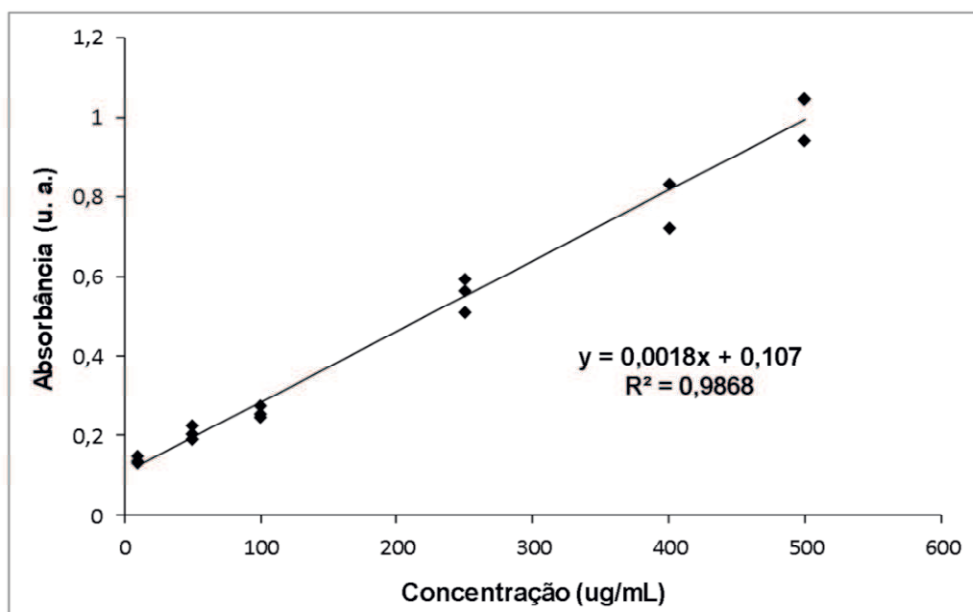
Em um estudo de sazonalidade com espécies da Caatinga, a *G. graciliflora* Lundell apresentou um maior teor de flavonoides totais durante o período do inverno, evidenciando assim que a espécie vegetal responde de maneira diferente as mudanças ambientais (CHAVES et al., 2013), e esse comportamento pode ainda estar relacionado as características genéticas em associação com a sua fisiologia vegetal (NEUBE et al., 2010).

➤ *Taninos Totais*

Na figura 5 observa-se a curva de calibração obtida com catequina, bem como a equação da reta e o seu coeficiente de relação (R^2).

O conteúdo de taninos totais existentes no extrato das folhas frescas de *G. graciliflora* Lundell atingiu a concentração de $5,96\mu\text{g mL}^{-1}$. Para este *Screening* Fitoquímico Quantitativo fica demonstrado que o teor de flavonoides totais é pouco mais que o dobro da concentração de taninos totais.

Figura 5: Curva de calibração construída com padrão de Catequina ($600\mu\text{g/ml}$) a 500nm



Estabelecer um grau de comparação entre a planta estudada com concentrações obtidas em outros estudos com a mesma espécie ou com espécies da mesma família corresponde a uma tarefa difícil, uma vez que não há trabalhos que demonstrem o doseamento de taninos totais. Araújo (2014), em seu estudo fitoquímico sobre o extrato liofilizado de *G graciliflora* Lundell, demonstrou apenas de forma qualitativa a presença desse metabólito. Oliveira (2013) e Rocha et al., (2013), mencionam em seus estudos a presença de taninos, em testes qualitativos, com extratos etanólico e hidroalcolico, respectivamente.

O conteúdo de taninos em um vegetal pode variar de acordo com a região vegetal a ser estudada ou por suas condições geográficas e climáticas (OLIVEIRA, 2013; SOUZA 2012), sendo extremamente importante a mensuração desse bioativo nas espécies vegetais, uma vez que, nos vegetais, os taninos são metabólitos que conferem uma adstringência principalmente aos frutos, e garantem a esse vegetal uma maior resistência as pragas, já que são compostos fenólicos que ligam-se a proteínas digestivas de insetos, podendo ainda, ser considerado um meio de defesa contra vírus, bactérias e fungos (TAIZ & ZEIGER, 2004). Essa capacidade de formação de complexos do tipo tanino-proteína/polissacarídeo confere a sua ação cicatrizante e anti-inflamatória (OLIVEIRA, 2013).

Estudos realizados com espécies vegetais da Caatinga, que possuem atividade antimicrobiana de interesse odontológico, destaca-se o trabalho realizado por Cartaxo et al. (2010), que realizou uma pesquisa fitoquímica quantitativa para o extrato das folhas de *Syzygium cumini* L.(jambolão) encontrando um teor de $54,26\mu\text{g mL}^{-1}$ de taninos totais.

Na aroeira (*Schinus terebinthifolius* Raddi), outra espécie comum no semiárido nordestino, detectou-se uma taxa de 2,70% de taninos para o fruto enquanto que na casca, obteve-se uma taxa de 2,50% de taninos (BERNARDES et al., 2011), evidenciando assim que a maior concentração desse metabólito pode, em alguns casos, ser encontrada nos seus frutos (TAIZ & ZEIGER, 2004).

➤ *Determinação do marcador fitoquímico por meio de espectrometria de massas por electrospray (ESI-MS)*

Na figura 6 observa-se o espectro ESI(-)- MS do extrato de *G graciliflora* Lundell, que exhibe a existência de íons referentes à moléculas desprotonadas $[M-H]^-$

m/z 193, de fórmula molecular concordante a $C_7H_{14}O_6$, propondo a presença do 3-O-metilchiro-inositol ou pinitol, pertencente a classe dos polióis cíclicos; m/z 593, de fórmula molecular compatível à $C_{27}H_{29}O_{15}$, sugerindo a presença do Kaempferol-3-O- β -D-glicopiranosil-(6" \rightarrow 1''')-O- α -L-rhamnopiranosídeo; além do íon m/z 609, com fórmula molecular compatível à $C_{27}H_{29}O_{16}$, indicando a existência da quercetina-3-o- β -D-glicopiranosil-(6" \rightarrow 1''')-O- α -L-rhamnopiranosídeo, conhecida por rutina ou vitamina P, que é um flavonóide. O presente estudo foi compatível com o trabalho desenvolvido por Aleixo (2015) que ao analisar o extrato de *G. graciliflora* Lundell identificou a presença marcante de flavonoides, principalmente a rutina.

Os espectros de ESI-MS/MS para cada íons encontram-se representados nas Figuras 7, 8, 9.

Figura 6: Espectro ESI(-)–MS obtido do extrato das folhas da *G. graciliflora* Lundell.

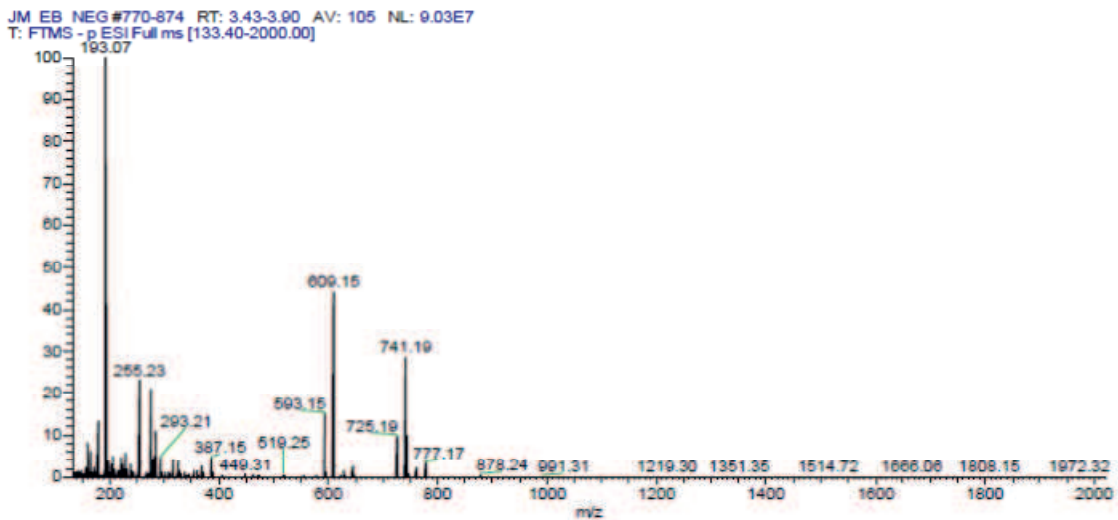


Figura 7: Espectro ESI(-)–MS/MS obtido para o íon de m/z 193.

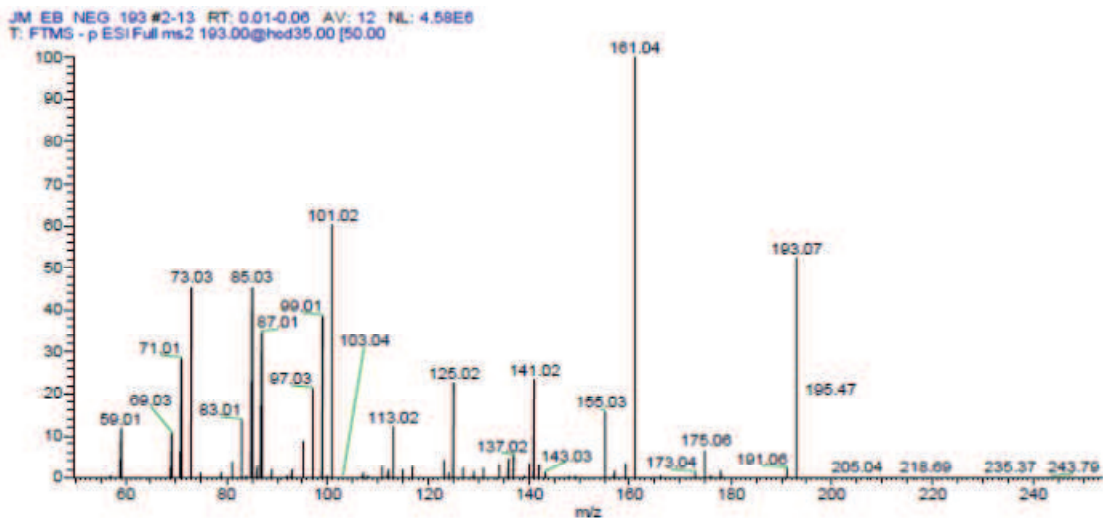


Figura 8: Espectro ESI(-) –MS/MS obtido para o íon de m/z 593.

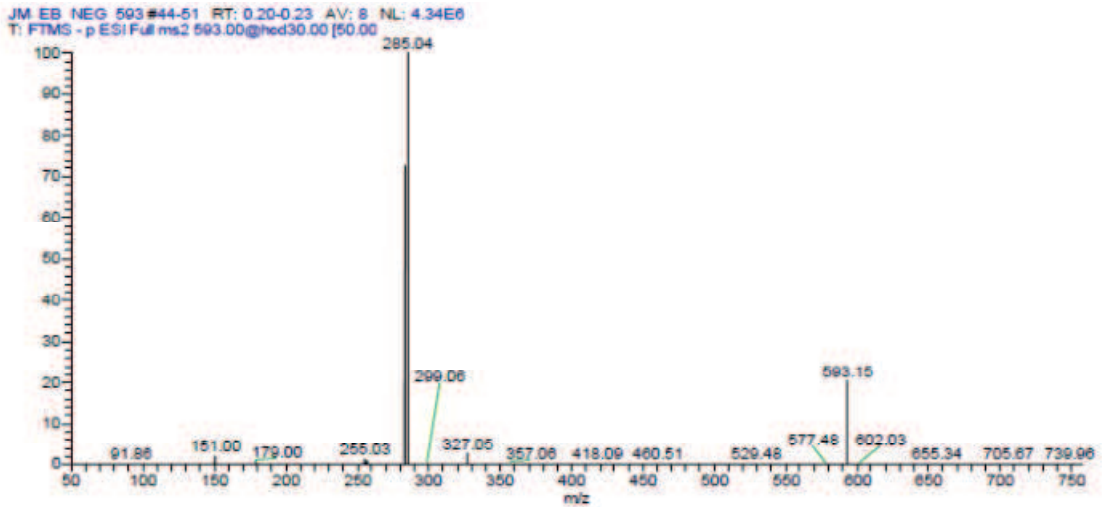
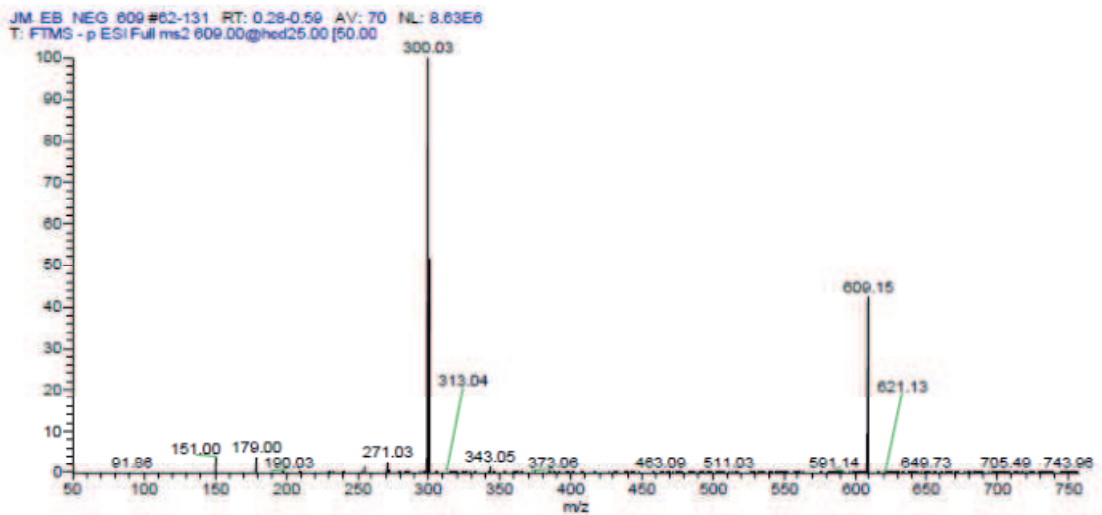
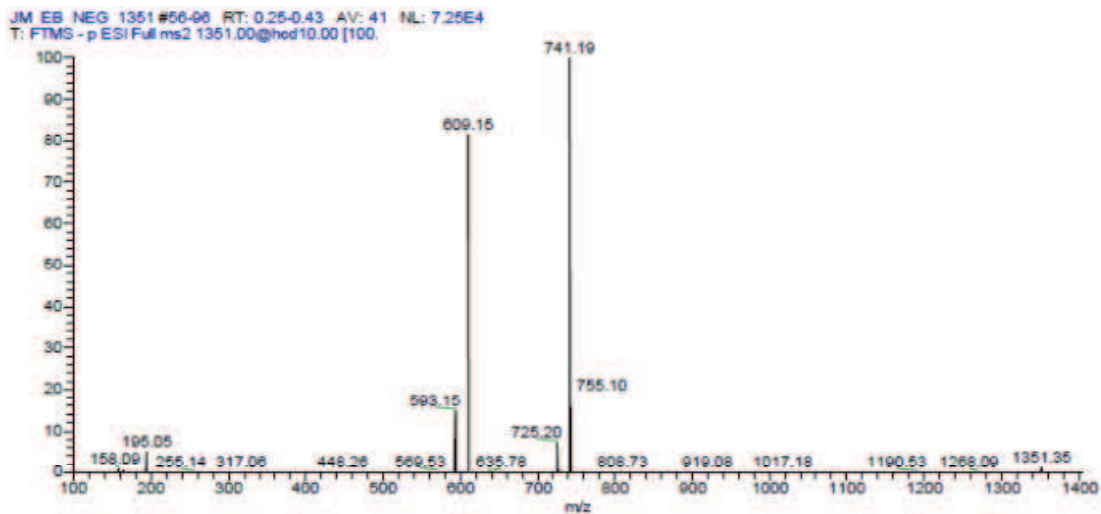


Figura 9: Espectro ESI(-) –MS/MS obtido para o íon de m/z 609.



A figura 10, expressa o espectro do íon de m/z 1351, e pode-se inferir a presença marcante de vitamina P (m/z 609), pois os íons principalmente fragmentados do espectro são íons de m/z 609 e 741. Logo, o íon de m/z 1351 é um dímero desprotonado e assimétrico da vitamina P e do íon de m/z 741, sendo este último um composto ainda não elucidado.

Figura 10: Espectro ESI(-)–MS/MS obtido para o íon de m/z 1351.



Os metabólitos secundários encontrados nas folhas de *G. graciliflora* Lundell conferem a este material vegetal diferentes propriedades farmacológicas, comprovando assim, os conhecimentos etnobotânicos (GRUPTA et al, 2008).

Ensaio farmacológicos apontam que os flavonoides exibem um alto poder sobre os sistemas biológicos, garantindo ação antimicrobiana, antiviral, antiúlceras, anti-inflamatório, e antioxidante. Acredita-se que os efeitos desses compostos estão diretamente relacionados com a inativação de sistemas enzimáticos, incluindo isomerases, oxidades, oxirredutases, polimerases, hidrolases, oxigenases, fosfatases, proteína fosfoquinases e aminoácido oxidades (MENDES et al., 2011). Com relação à ação antimicrobiana, estima-se que os flavonoides atuem na inativação enzimática e na formação de complexos com proteínas estruturais da parede celular dos microrganismos (SILVA et al., 2012a; MENDES et al., 2011).

A vitamina P e o Kaempferol, por exemplo, são bioativos que possuem seus efeitos antioxidante, cicatrizante, anti-inflamatório e antimicrobiano reconhecidos (HE et al., 2016; COELHO et al., 2005). Esses compostos apresentam atividade antimicrobiana contra representantes Gram negativos (*Escherichia coli*, *Enterococcus faecalis*, *Pseudomonas aeruginosa*) e Gram positivos (*Staphylococcus aureus*, *Streptococcus mitis*, *Streptococcus mutans*), além das leveduras (ARAÚJO, 2014; RASHED & BUTMARIU, 2014; ROCHA et al., 2013; OZÇELIK et al., 2011). Por sua vez, os polióis são oriundos do metabolismo dos carboidratos e estão vinculados à ação antioxidante (AGARIE et al., 2009; WILLIAMSON et al., 2002).

Diante dos resultados obtidos para o extrato no screening fitoquímico e na determinação do seu marcador químico, a *G. graciliflora* Lundell pode constituir uma fonte promissora para o desenvolvimento de formulações contra microrganismos envolvidos com a formação do biofilme dentário.

5.1.3 Screening Microbiológico

Em referencia a pesquisa *in vitro*, o emprego da técnica de microdiluição em caldo apresenta resultados mais confiáveis para demonstrar a susceptibilidade dos microrganismos aos agentes antimicrobianos (ROCHA et al., 2013). A afirmação desse estudo justificam os achados deste que observou de um modo geral, uma expressiva sensibilidade da técnica de microdiluição em caldo com o ENGG.

Os resultados da Concentração Inibitória Mínima (CIM) e da Concentração Bactericida Mínima (CBM) do ENGG encontram-se na Tabela 4. Apenas uma cepa testada apresentou resistência.

Tabela 4: Determinação de Concentração Inibitória Mínima (CIM) e Concentração Bactericida Mínima (CBM) do ENGG.

Microrganismo	CIM (µL/mL)	CBM (µL/mL)
<i>Streptococcus mutans</i>	12,50	12,50
<i>Streptococcus salivarius</i>	12,50	25,00
<i>Streptococcus parasanguinis</i>	Resistente	Resistente
<i>Streptococcus oralis</i>	6,25	6,25
Controle positivo	< 1,00	< 1,00

Segundo a classificação de Holetz et al. (2002), o ENGG apresentou uma forte atividade antimicrobiana para o *Streptococcus mutans* (12,50 e 12,50 µL/mL), *Streptococcus salivarius* (12,50 e 25,00 µL/mL), *Streptococcus oralis* (6,25 e 6,25 µL/mL), sendo resistente apenas para o *Streptococcus parasanguinis*. Em um estudo semelhante sobre patógenos orais, desenvolvido por Araújo et al., (2014), observou-se uma forte atividade do extrato liofilizado da *G. graciliflora* Lundell contra três microrganismos do gênero *Streptococcus*, onde a CIM e CBM foram inferiores para o *S. salivarius* (6,25 e 6,25 µL/mL) e iguais para o *S. mutans* (12,50 e 12,50 µL/mL), quando comparados com os resultados obtidos neste estudo.

Na avaliação de susceptibilidade microbiana, com plantas que recobrem o bioma da Caatinga, constatou-se uma forte atividade antimicrobiana do extrato etanólico de *G. graciliflora Lundell* contra dez microrganismos testados. O estudo avaliou a ação do extrato vegetal contra enterobactérias, e patógenos como o *Streptococcus salivarius* e o *Streptococcus oralis*, que estão relacionados com a formação do biofilme dental, onde todos os microrganismos foram sensíveis a uma mesma concentração: inferior a 25,00µL/mL, tanto para CIM quanto para CBM (CHAVES et al., 2013).

Em uma análise sobre o potencial de plantas nativas do semiárido brasileiro, que envolveu a casca e folhas de seis espécies vegetais, a ação do extrato hidroalcoólico de cascas e folhas de *G. graciliflora Lundell* contra patógenos relacionados com a infecção endodôntica, demonstrou que o mesmo possui forte atividade antimicrobiana contra as enterobactérias *E. faecalis* (12,50 e 6,25 µL/mL) e *E. coli* (12,50 e 6,25 µL/mL) e ainda são ativos em mesma intensidade contra *S. aureus* (12,50 e 12,50 µL/mL), que representa um importante papel na colonização do biofilme dentário (ROCHA et al., 2013).

Santos (2013), avaliou a atividade antimicrobiana contra cinco patógenos orais, onde os mesmos apresentaram sensibilidade, porém o melhor resultado foi contra o *Streptococcus mutans*.

Embora o ENGG tenha inibido três dos quatro microrganismos testados, seu resultado mais importante foi contra o *Streptococcus mutans*, o principal microrganismo envolvido em doenças da cavidade bucal., ficando demonstrado que este vegetal pode representar uma importante alternativa para os cuidados com a saúde bucal.

5.1.4 Ensaio de Toxicidade em *Artemia salina*

Os ensaios de toxicidade aguda são executados com o intuito de apontar prováveis danos que novos componentes naturais ou sintéticos e seus produtos podem afetar à saúde humana. No tocante ao teste da toxicidade aguda, pode-se entender que este ensaio *in vitro* é empregado para classificar substâncias de acordo com o seu potencial de letalidade ou toxicidade (BLAAUBOER, 2003).

O teste de toxicidade aguda envolvendo *Artemia salina* é considerado um método de baixa sensibilidade para determinados produtos e alguns tipos de

efluentes (CETESB, 1991). Porém, devido à simplicidade de manuseio, rapidez e baixo custo, corroboram para a adoção desta técnica em muitos estudos. Além disso, este teste é fortemente utilizado em análises preliminares de toxicidade geral, visto que, é através dele que determina-se a concentração média letal (CL_{50}), índice que provoca a morte de 50% da população estudada (LUNA, et al., 2005).

Existe uma relação entre o grau de toxicidade dos extratos vegetais e a CL_{50} sobre as larvas de *A. salina*, onde valores superiores a 1.000 μ g/mL são atóxicos (MEYER et al., 1982).

Neste estudo, realizado em triplicata, nenhuma das concentrações do ENGG provocou 50% de mortalidade nas larvas de *A. salina*. A CL_{50} calculada para o ENGG foi equivalente a 699,62 μ g/mL. Portanto, esta concentração está abaixo de 1.000 μ g/mL. Assim, nas concentrações testadas (Tabela 5), o extrato apresentou toxicidade moderada contra *A. salina*.

Tabela 5: Percentual de larvas mortas de *A. salina* em diferentes concentrações do ENGG.

Concentração do ENGG (μ g/mL)	Número de larvas mortas
100	8
50	8
25	8
12,5	2
6,25	0
Controle	0

Em oposição a este estudo, Costa et al., 2010 ao realizar testes de toxicidade aguda em plantas medicinais que recobrem a bacia do Araripe, observou que o extrato de *G. graciliflora* Lundell, provocou a letalidade de larvas de *A. salina*, com uma CL_{50} correspondente a 478,0 μ g/mL., ou seja, de acordo com a metodologia proposta por Meyer et al. (1982), o extrato foi considerado tóxico. É notório que a diferença verificada ao comparar estes estudos, pode ser justificada pela variabilidade, presença e pela concentração de constituintes químicos existentes no material vegetal analisado (SANTOS et al., 2010).

5.1.5 Estudo dos Parâmetros Físico-Químicas do Extrato Nebulizado de *Guapira graciliflora* Lundell

Sabe-se que a natureza dos extratos vegetais é fluida, e a sua utilização no desenvolvimento de formas farmacêuticas líquidas, semissólidas ou sólidas ocorrerá mediante a retirada do líquido extrator (SILVA JUNIOR et al., 2006). Um mecanismo eficiente na retirada do solvente consiste em submeter o extrato líquido a secagem por spray drier, obtendo dessa forma um extrato nebulizado. O extrato nebulizado pode ser um produto farmacêutico final, como também, ser empregado no desenvolvimento de diferentes formulações (VASCONCELOS et al., 2005).

Para este estudo, obteve-se a partir de 29,75 litros de extrato aquoso, um rendimento de 23,50g do pó nebulizado.

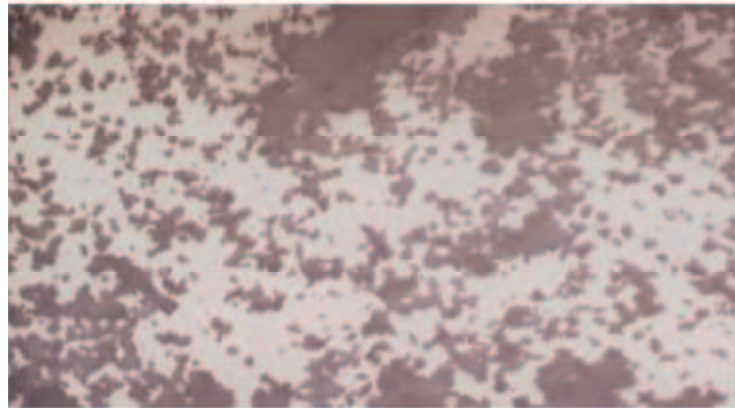
O Controle de Qualidade em Fitoterápicos, abordado na RDC nº 10/2010, aponta critérios que devem ser aplicados aos produtos vegetais de forma que o mesmo apresente adequações que o tornem apropriado para o uso farmacêutico. A Farmacopéia Brasileira V (2010) propõe técnicas a serem realizadas na caracterização de produtos naturais, são elas: teor de cinzas, perda por dessecação, pH, entre outros.

Neste estudo foi realizado a padronização do extrato nebulizado de folhas de *G. graciliflora* Lundell, através dos testes farmacopéicos descritos abaixo, sendo os mesmos realizados em triplicata.

5.1.6 Dimensão da partícula

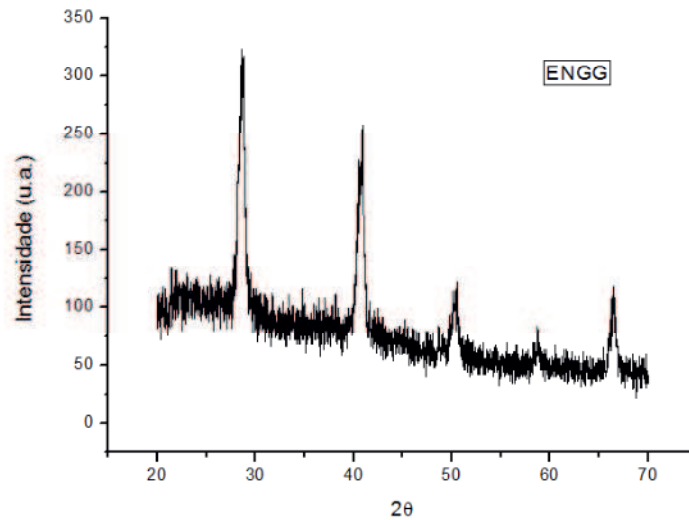
A análise microscópica do extrato obtido por aspensão (Figura 11) revela que o mesmo apresenta coloração castanha e distribuição não uniforme do tamanho das partículas, com tendência a formação de aglomerados devido a sua natureza altamente higroscópica, impossibilitando dessa forma determinar as dimensões de suas partículas. Na análise do extrato nebulizado de folhas braúna (*Schinopsis brasiliensis* Engler), visando o seu emprego no desenvolvimento de uma formulação odontológica, Santos (2013), analisou o seu extrato vegetal por microscopia óptica, obtendo sua circunferência, raio, diâmetro e área, demonstrando assim, que o nebulizado dessa espécie do semiárido nordestino, possui uma maior resistência à umidade do que o ENGG.

Figura 11: Microscopia óptica do ENGG (200x).



O difratograma (Figura 12) referente ao ENGG apresentou um elevado grau de amorfização, havendo ainda o aparecimento de picos de cristalinidade nos ângulos de 28,7°; 40,8°; 50,45°; 58,8° e 66,4°, que podem ser atribuídos à presença de compostos que sofreram cristalinização durante o processo de secagem. É importante ressaltar que os picos demonstrados para esta amostra não estão relacionados com o adjuvante farmacotécnico Aerosil®, utilizado durante o processo de nebulização, uma vez que os picos identificados não imprimem uma relação com a arquitetura organizacional deste estabilizante farmacêutico (COSTA NETO, 2014).

A amorfização de um extrato é atribuída, a uma rica variedade fitoquímica, dificultando a formação de retículos cristalinos. A análise por difratograma desenvolvida por Santana (2014) de extratos fitoterápicos obtidos por Spray Drier, obteve um resultado concordante com o presente trabalho, uma vez que a amostra do pó de *Ximenia americana L.*, apresentou uma natureza amorfa e picos de cristalinidade nos ângulos de 37,8°, 44,0° e 64,4°, formados pela cristalinização de metabólitos durante o processo de secagem por aspersão.

Figura 12: Difratoograma referente ao ENGG.

5.1.7 Determinação da perda por dessecação

A determinação de umidade da amostra representa um importante aliado no desenvolvimento de formulações farmacêuticas e em seu controle de qualidade. A matéria-prima que possui uma grande quantidade de água tem a sua estabilidade química comprometida por reações de hidrólise, e ainda sofrem com a proliferação de microrganismos (COSTA et al 2009; NUNES et al., 2009).

A perda por dessecação calculada para o ENGG foi de $3,98 \pm 0,002$, conforme está apresentado na Tabela 6. A Farmacopéia Brasileira V (2010) recomenda que o pó de extratos vegetais medicinais tenha uma perda por dissecação inferior a 14%, certificando dessa forma, que o pó referente a este estudo, encontra-se dentro das especificações citadas.

Tabela 6: Parâmetros físico-químicos avaliados com o ENGG.

Parâmetros avaliados	Resultados obtidos \pm Desvio padrão
Perda por dissecação (%)	$3,98 \pm 0,002$
pH	$5,49 \pm 0,0001$
Densidade (g/mL)	$0,456 \pm 0,005$

5.1.8 Determinação do pH

O pH da solução aquosa a 1% (p/v), do extrato aspergido foi de $5,49 \pm 0,0001$ (Tabela 6). Portanto, a solução analisada tem caráter fracamente ácido, já que a

Farmacopéia Brasileira V edição (2010) estabelece que uma solução é ácida quando o pH está no intervalo de 1,00 a 6,60; onde, 4,00 a 6,60 são soluções ácidas fracas, 1,00 a 4,00 são soluções ácidas fortes;

A determinação desse parâmetro físico-químico em amostras vegetais é amplamente investigado: Souza (2012) e Santana (2014), demonstraram que extratos nebulizados de *Opuntia ficus-indica* (L.) e *Schinopsis brasiliensis Engler.*, possuem pH igual a $4,54 \pm 0,05$ e $4,85 \pm 0,0236$, respectivamente, apresentando também caráter fracamente ácido.

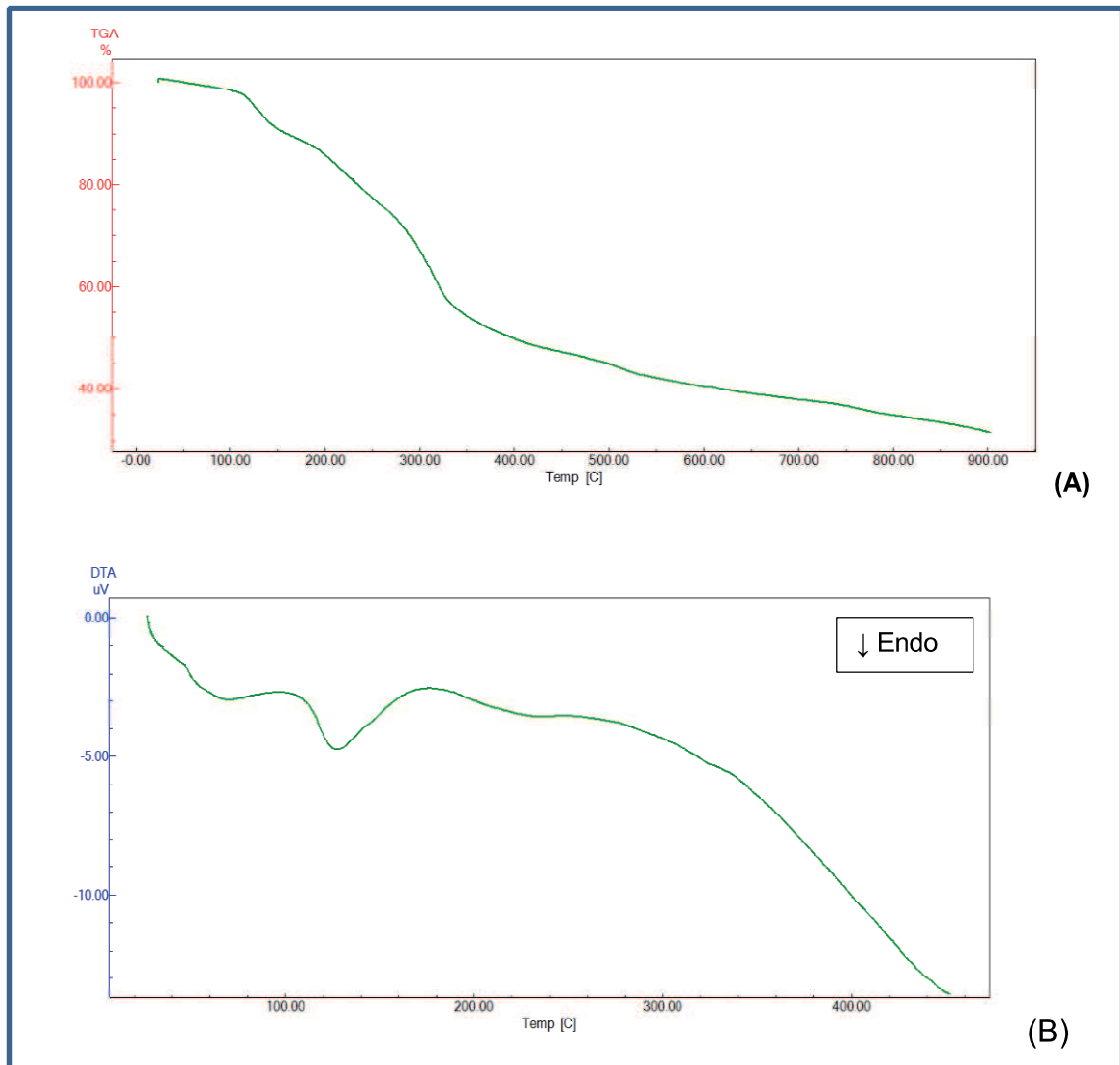
5.1.9 Determinação da Densidade

A densidade do extrato nebulizado foi de $0,456 \pm 0,005$ (Tabela 6). Esse é um parâmetro de controle de qualidade importante sob o ponto de vista tecnológico, uma vez que confere forte influência no processo de elaboração de formas farmacêuticas fitoterápicas. A determinação da densidade é um parâmetro físico-químico amplamente estudado em extratos nebulizados fitoterápicos: Costa et al. (2009), avaliou o pó de folhas de arruda (*Montrichardia linifera Engler*), obtendo a densidade de $0,32 \pm 0,02$; Souza (2012), determinou que a densidade do extrato em pó de *Opuntia ficus-indica* (L) foi de $0,64 \pm 0,02$.

5.1.10 Estudo de Pré-formulação

➤ *Extrato nebulizado de Guapira graciliflora Lundell*

As curvas de TG e DTA do extrato nebulizado de *G. graciliflora Lundell* (ENGG) encontram-se na figura 13. Os resultados obtidos sobre os percentuais de perda de massa e variação de temperatura de cada evento observado no processo estão distribuídos na tabela 7, e os dados referentes aos picos endotérmicos são demonstrados na tabela 8.

Figura 13: Curvas TG (A) e DTA (B) do ENGG.**Tabela 7:** Curva TG do extrato ENGG.

Etapas de decomposição	Temperatura inicial (°C)	Temperatura final (°C)	Teor da perda (%)
Primeira	116,57	139,78	8,56
Segunda	202,26	236,45	13,62
Terceira	298,73	347,33	34,32
Quarta	675,50	745,92	2,38

Na análise termogravimétrica, o ENGG exibiu uma perda de massa na temperatura de 105°C de cerca de 3,34%, provavelmente associada à perda de água. Esse resultado foi concordante com o valor obtido no ensaio gravimétrico de perda por dissecação (3.98%), evidenciando que a TG pode fornecer uma estimativa do conteúdo de água residual existente em uma amostra após seu processamento.

A TG indicou uma perda de massa em diferentes etapas e possivelmente devido à complexidade da amostra, que por possuir origem vegetal, contém diferentes compostos químicos. A perda de umidade da amostra ocorreu até a temperatura de 139,78°C, que representou 8,56% da sua massa. A segunda etapa de decomposição, sob um intervalo de temperatura entre 202,26 e 236,45°C, correspondeu ao processo inicial de decomposição térmica do ENGG. A partir dessa etapa ocorre uma intensa perda de massa da amostra, que fundamenta o seu processo mais intenso de decomposição, entre as temperaturas de 298,73 e 347,33°C, tendo uma perda de 34,32%. A perda registrada na terceira etapa de decomposição aproximada à perda obtida por Silva et al., (2006), para o extrato vegetal de confrei (*Symphytoun officinale L.*) que foi de 33,15%.

No final do processo, em torno de 745,92°C, verificou-se a presença de um resíduo mineral que não se decompõe. O resíduo mineral equivale ao teor de cinzas da amostra, que foi de 2,38%, ocorrido em uma variação de temperatura entre 675,50 e 745,92°C. Atribui-se a esse resíduo ao teor de Aerosil[®] empregado na amostra em 20%.

Medeiros et al. (2007) ao estudar sob uma temperatura de até 900°C, o comportamento térmico de folhas de *Origanum mangerosa L.*, observou que a sua amostra admitia quatro picos de decomposição, demonstrando dessa forma, um perfil termogravimétrico semelhante ao deste estudo. Entretanto, o referido autor relata uma perda de massa inicial de 10,19%.

A curva DTA do ENGG (Tabela 8), apontou que os processos térmicos que aconteceram entre um intervalo de temperatura de 69,70°C até 238,20°C. Correlacionando esses eventos com a curva de TG do extrato, podemos sugerir que o primeiro pico de decomposição ocorreu com $\Delta H = -25,85 \text{ J/g}$ sob uma temperatura de 69,70°C, e provavelmente, esse evento químico está relacionado com a perda de constituintes voláteis da amostra. A decomposição térmica do extrato pode estar vinculada ainda, a uma grande variedade de metabólitos secundários, que são constituintes de materiais de origem vegetal, principalmente por flavonoides e taninos.

Tabela 8: Dados de DTA referentes aos picos do ENGG.

Picos de decomposição	Pico (°C)	Onset (°C)	Calor (J/g)
Primeiro	69,70	47,66	-25,85
Segundo	127,87	112,47	-110,88
Terceiro	238,20	192,24	-10,89

5.1.11 Misturas fármaco x excipientes na proporção 1:1

O estudo de pré-formulação é o recurso inicial no desenvolvimento de uma forma farmacêutica, visto que consiste na análise de parâmetros físicos e químicos do fármaco e a sua associação com os adjuvantes farmacêuticos (MEDEIROS et al., 2002). Para a análise, emprega-se o sistema de mistura binária, que tem por finalidade apontar prováveis incompatibilidades que possam surgir. Portanto, foram desenvolvidas misturas na proporção 1:1 com o ENGG e os excipientes empregados na formulação de um enxaguatório bucal.

5.1.12 Conservantes

Dentre os agentes conservantes, foram estudados o propilparabeno, metilparabeno e o benzoato de sódio, buscando avaliar qual desses componentes apresenta melhor comportamento térmico com o extrato nebulizado.

A curva de DTA do propilparabeno e a mistura binária 1:1 (Figura 14) apresentou dois e quatro picos endotérmicos, respectivamente. Para o propilparabeno, o primeiro pico corresponde ao seu ponto de fusão, que ocorre entre 95 e 99°C, conforme estabelece a Farmacopéia Brasileira V edição (2010), apresentando nesta análise, sob a temperatura de 98,33°C ($\Delta H = - 222,04$ J/g), e o segundo representou a sua decomposição na temperatura de 304,45°C ($\Delta H = - 798,43$ J/g). A mistura binária 1:1 apresentou o primeiro pico em 43,54°C ($\Delta H = - 1,55$ J/g), que provavelmente tenha ocorrido por perda de umidade da amostra. O segundo pico, demonstrou o ponto de fusão do excipiente que ocorreu sob uma temperatura de 95,10°C ($\Delta H = - 67,42$ J/kg) e o pico de decomposição final foi estabelecido na temperatura de 227,18 °C ($\Delta H = - 29,93$ J/g) (Tabela 9).

Figura 14: Curva DTA do ENGG (verde), excipiente (vermelho) e mistura binária produzida na proporção 1:1 (azul) – curva do propilparabeno.

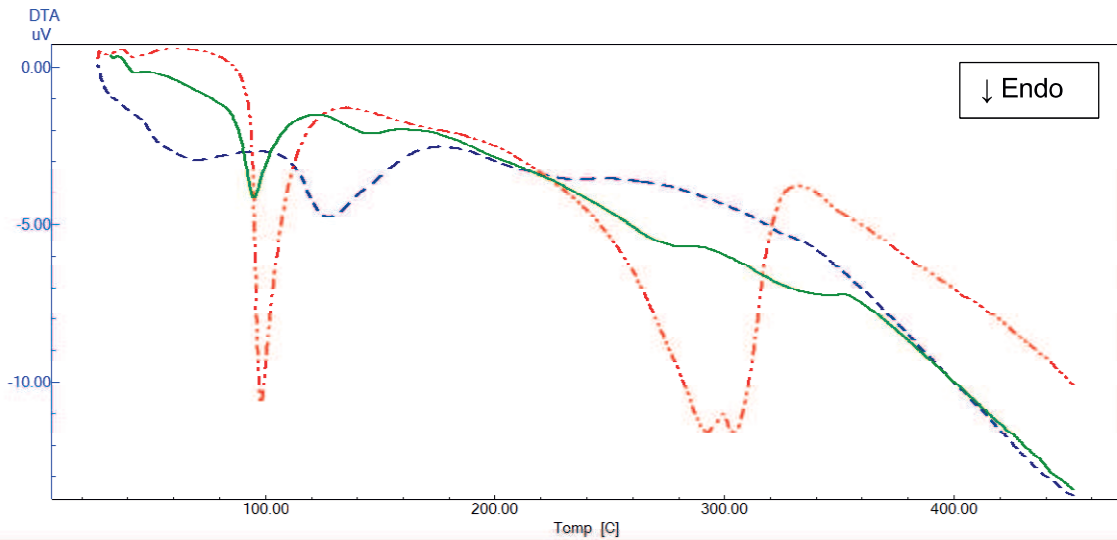


Tabela 9: Dados DTA referentes aos processos de transição de fases do ENGG, excipientes e mistura binária produzidas com o ENGG + propilparabeno.

Amostras	Picos de decomposição	Pico (°C)	Onset (°C)	Calor (J/g)
ENGG	Primeiro	69,70	47,66	-25,85
	Segundo	127,87	112,47	-110,88
	Terceiro	238,20	192,24	-10,89
Propilparabeno	Primeiro	98,33	93,92	-222,04
	Segundo	304,45	267,57	-789,43
Mistura 1:1	Primeiro	43,53	38,02	-1,55
	Segundo	95,10	88,14	-67,42
	Terceiro	145,40	129,40	-8,47
	Quarto	227,18	251,65	-29,93

A curva DTA do metilparabeno e a mistura binária 1:1 (Figura 15) apontou três e dois picos endotérmicos, respectivamente. O primeiro pico de 54,87°C ($\Delta H = -3,57$ J/g) para o adjuvante ocorreu uma perda de água da amostra. O segundo pico ocorre na temperatura de 128,80°C ($\Delta H = -261,90$ J/g), demonstrando assim o ponto de fusão do excipiente estabelecido na Farmacopéia Brasileira V edição (2010). Na mistura 1:1, o primeiro pico 115,63°C ($\Delta H = -3,57$ J/g) demonstra uma perda de água da amostra, além da desaparecimento do ponto de fusão do excipiente, que pode ser responsável por comprometer a estabilidade do ENGG. Em relação à decomposição final, para o metilparabeno ocorreu em 300,21°C ($\Delta H = -779,06$ J/g) e em 277,76°C ($\Delta H = -43,41$ J/g), para a mistura na proporção 1:1. (Tabela 10).

Figura 15: Curva DTA do ENGG (verde), excipiente (vermelho) e mistura binária produzida na proporção 1:1 (azul) – curva do metilparabeno.

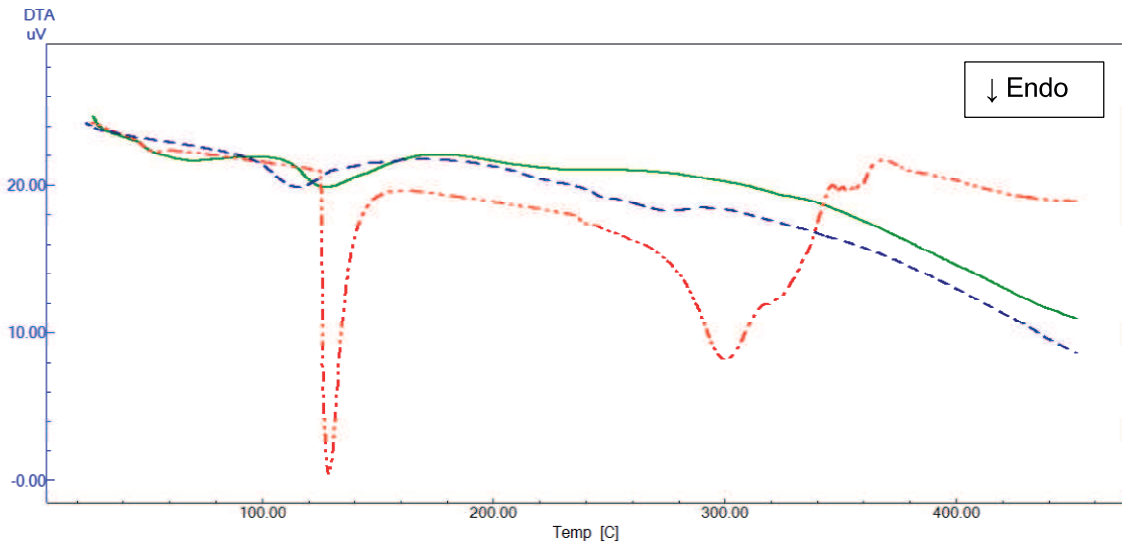


Tabela 10: Dados DTA referentes aos processos de transição de fases do ENGG, excipientes e mistura binária produzidas com o ENGG + metilparabeno.

Amostras	Picos de decomposição	Pico (°C)	Onset (°C)	Calor (J/g)
ENGG	Primeiro	69,70	47,66	-25,85
	Segundo	127,87	112,47	-110,88
	Terceiro	238,20	192,24	-10,89
Metilparabeno	Primeiro	54,87	52,13	-3,57
	Segundo	128,80	125,57	-261,90
	Terceiro	300,21	294,20	-779,06
Mistura 1:1	Primeiro	115,63	98,69	-112,35
	Segundo	277,76	240,92	-43,41

O estudo do comportamento térmico do benzoato de sódio e a mistura binária 1:1 (Figura 16) apresentou dois e três picos endotérmicos, respectivamente. Para o excipiente, o primeiro pico foi verificado na temperatura de 68,24°C ($\Delta H = -107,84$ J/g), enquanto que para a mistura 1:1, ocorreu na temperatura de 66,48°C ($\Delta H = -116,33$ J/g). Conforme estabelece a Farmacopéia Brasileira V edição (2010), o ponto de fusão do benzoato de sódio é estimado entre 410 e 430°C e experimentalmente, o ultimo pico, relacionado à decomposição final foi atingido na temperatura de 436,56°C ($\Delta H = -102,52$ J/g), para o adjuvante, havendo, portanto um deslocamento do seu ponto de fusão, já para a mistura, o pico na temperatura de 342,68°C ($\Delta H = -254,63$ J/g), demonstra um deslocamento do ponto de fusão do benzoato de sódio, podendo comprometer a estabilidade do ENGG (Tabela 11).

Figura 16: Curva DTA do ENGG (verde), excipiente (vermelho) e mistura binária produzida na proporção 1:1 (azul) – curva do benzoato de sódio.

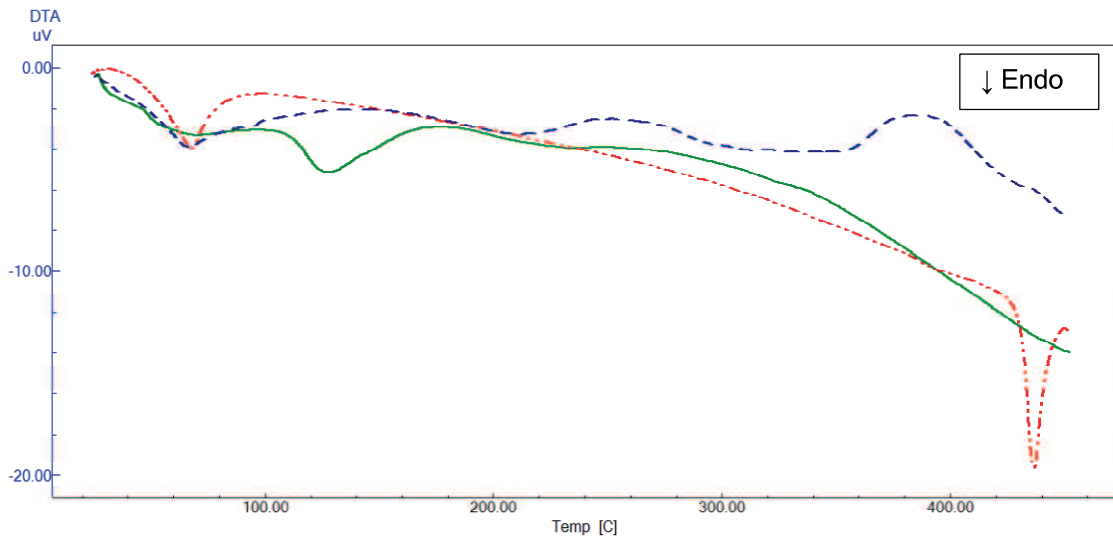


Tabela 11: Dados DTA referentes aos processos de transição de fases do ENGG, excipientes e mistura binária produzidas com o extrato ENGG + benzoato de sódio.

Amostras	Picos de decomposição	Pico (°C)	Onset (°C)	Calor (J/g)
ENGG	Primeiro	69,70	47,66	-25,85
	Segundo	127,87	112,47	-110,88
	Terceiro	238,20	192,24	-10,89
Benzoato de sódio	Primeiro	68,24	49,81	-107,84
	Segundo	436,56	430,10	-102,52
Mistura 1:1	Primeiro	66,48	53,21	-116,33
	Segundo	212,61	170,16	-76,94
	Terceiro	342,68	276,18	-254,63

De acordo com os resultados obtidos, em relação aos agentes conservantes, sugere-se que o propilparabeno apresentou o melhor perfil térmico, uma vez que o referido excipiente não ocasionou modificações físico-químicas relevantes no ENGG. Portanto, o propilparabeno foi o excipiente eleito para compor a formulação do enxaguatório bucal, por apresentar melhor estabilidade perante o extrato vegetal.

5.1.13 Tensoativos

Os agentes tensoativos estudados foram o lauril sulfato de sódio e o polissorbatato 80 (tween 80[®]), com o objetivo de avaliar qual o excipiente farmacêutico apresentaria melhor desempenho com o ENGG.

As curvas de DTA demonstraram que o polissorbato 80 e a mistura binária 1:1 (Figura 17) apresentaram três e um pico endotérmico, respectivamente. O primeiro pico do excipiente ocorreu na temperatura de 126,47,13°C ($\Delta H = -43,91$ J/g). Para a mistura binária na proporção 1:1, verifica-se que o excipiente interfere na estabilidade do ENGG e neste caso, o único pico surgiu na temperatura de 94,20°C ($\Delta H = -50,83$ J/g) (Tabela 12).

Figura 17: Curva DTA do ENGG (verde), excipiente (vermelho) e mistura binária produzida na proporção 1:1 (azul) – curva do polissorbato 80.

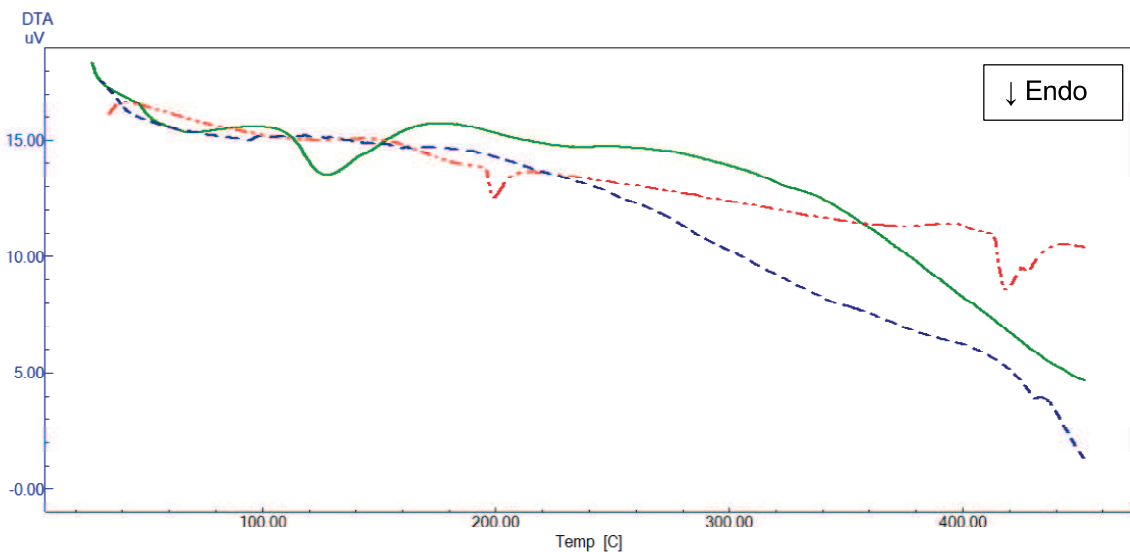


Tabela 12: Dados DTA referentes aos processos de transição de fases do ENGG, excipientes e mistura binária produzidas com o extrato ENGG + polissorbato 80.

Amostras	Picos de decomposição	Pico (°C)	Onset (°C)	Calor (J/g)
ENGG	Primeiro	69,70	47,66	-25,85
	Segundo	127,87	112,47	-110,88
	Terceiro	238,20	192,24	-10,89
Tween 80 [®]	Primeiro	126,47	47,03	-43,91
	Segundo	154,98	158,82	-1,75
	Terceiro	199,23	195,85	-16,95
Mistura 1:1	Primeiro	94,20	38,41	-50,83

As curvas térmicas de DTA do lauril sulfato de sódio e da mistura binária na proporção 1:1 (Figura 18) apontam que as mesmas apresentaram três picos endotérmicos. O primeiro pico endotérmico do excipiente foi registrado em uma temperatura de 62,15°C ($\Delta H = -16,66$ J/g), enquanto que para a mistura binária 1:1,

o pico foi de 108,13°C ($\Delta H = -14,32$ J/g) que têm a sua ocorrência justificada pelo processo de desidratação das amostras. O segundo pico de decomposição do excipiente e da mistura binária 1:1 foram alcançados sob a temperatura de 110,31°C ($\Delta H = -42,45$ J/g) e 143,45°C ($\Delta H = -3,91$ J/g), respectivamente. O último pico da amostra do excipiente surgiu na temperatura de 274,12°C ($\Delta H = -458,62$ J/g) e para a mistura entre o extrato-excipiente o pico de decomposição apresentou-se na temperatura de 238,85°C ($\Delta H = -105,08$ J/g).

Figura 18: Curva DTA do ENGG (verde), excipiente (vermelho) e mistura binária produzida na proporção 1:1 (azul) – curva do lauril sulfato de sódio.

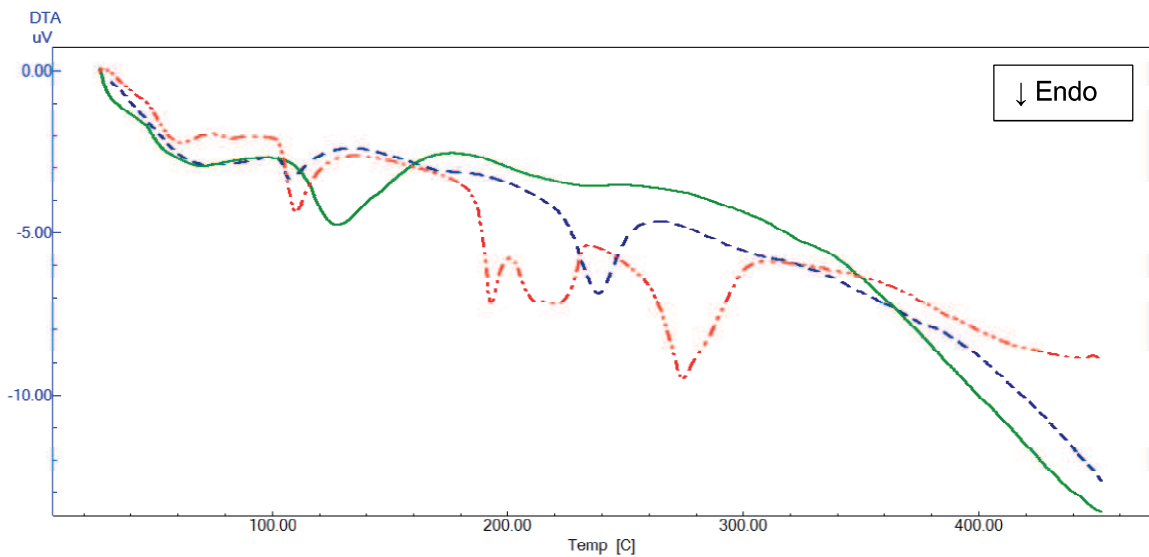


Tabela 13: Dados DTA referentes aos processos de transição de fases do ENGG, excipientes e mistura binária produzidas com o ENGG + lauril sulfato de sódio.

Amostras	Picos de decomposição	Pico (°C)	Onset (°C)	Calor (J/g)
ENGG	Primeiro	69,70	47,66	-25,85
	Segundo	127,87	112,47	-110,88
	Terceiro	238,20	192,24	-10,89
Lauril sulfato de sódio	Primeiro	62,15	49,02	-16,66
	Segundo	110,31	104,93	-42,45
	Terceiro	274,12	187,88	-458,62
Mistura 1:1	Primeiro	108,13	103,45	-14,32
	Segundo	143,45	151,11	-3,91
	Terceiro	238,85	222,63	-105,08

Com base nos resultados apresentados sugere-se, para as condições analisadas, que o lauril sulfato de sódio apresentou melhor perfil térmico, sendo o

agente tensoativo eleito para compor a formulação do enxaguatório bucal, uma vez que o polissorbato 80 parece ter uma maior intensidade de comprometimento da curva térmica do ENGG.

5.1.14 Umectantes

Dentre os umectantes, foram estudados o sorbitol e o propilenoglicol, com o propósito de analisar qual o excipiente apresentaria melhor comportamento térmico com o ENGG.

A curva de DTA do propilenoglicol e a mistura binária 1:1 (Figura 19) apresentaram, em ambos os casos, a mesma quantidade de picos endotérmicos. O primeiro pico foi detectado na temperatura de 110,75°C ($\Delta H = -440,82$ J/g), para o excipiente e na temperatura de 98,71°C ($\Delta H = -440,82$ J/g), para a mistura em proporção 1:1, que representam um processo de decomposição. O pico de decomposição final foi estabelecido para o excipiente e a mistura 1:1 na temperatura de 201,06°C ($\Delta H = -290,42$ J/g) e 254,30°C ($\Delta H = -11,18$ J/g), respectivamente.

Figura 19: Curva DTA do extrato ENGG (verde), excipiente (vermelho) e mistura binária produzida na proporção 1:1 (azul) – curva do propilenoglicol.

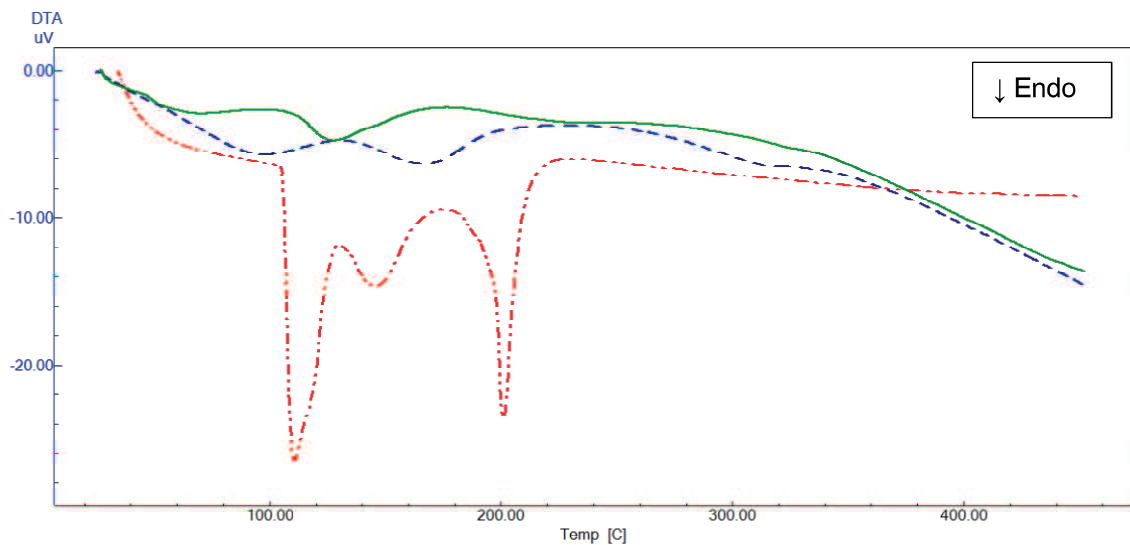


Tabela 14: Dados DTA referentes aos processos de transição de fases do ENGG, excipientes e mistura binária produzidas com o extrato ENGG + propilenoglicol

Amostras	Picos de decomposição	Pico (°C)	Onset (°C)	Calor (J/g)
ENGG	Primeiro	69,70	47,66	-25,85
	Segundo	127,87	112,47	-110,88
	Terceiro	238,20	192,24	-10,89
Propilenoglicol	Primeiro	110,75	106,35	-440,82
	Segundo	145,85	134,53	-125,74
	Terceiro	201,06	196,42	-290,42
Mistura 1:1	Primeiro	98,71	84,92	-62,43
	Segundo	167,00	141,85	-120,64
	Terceiro	254,30	272,36	-11,18

O estudo térmico do sorbitol demonstra que o excipiente e a mistura binária a 1:1 apresentaram dois picos endotérmicos (Figura 20). Para o excipiente, o primeiro pico surgiu na temperatura de 86,44°C ($\Delta H = -515,30$ J/g) que representa uma perda de água amostra; o segundo pico, surgiu na temperatura de 326,69 ($\Delta H = -530,95$ J/g) e demonstra uma fase de degradação deste adjuvante farmacêutico. Em relação à mistura do extrato-excipiente na proporção 1:1, o primeiro pico ocorreu numa temperatura 129,40°C ($\Delta H = -42,92$ J/g) que aproxima-se do segundo pico do ENGG; já o segundo pico surge em uma temperatura de 330,08 ($\Delta H = -287,13$ J/g) e corresponde a uma etapa de final decomposição

Figura 20: Curva DTA do ENGG (verde), excipiente (vermelho) e mistura binária produzida na proporção 1:1 (azul) – curva do sobitol.

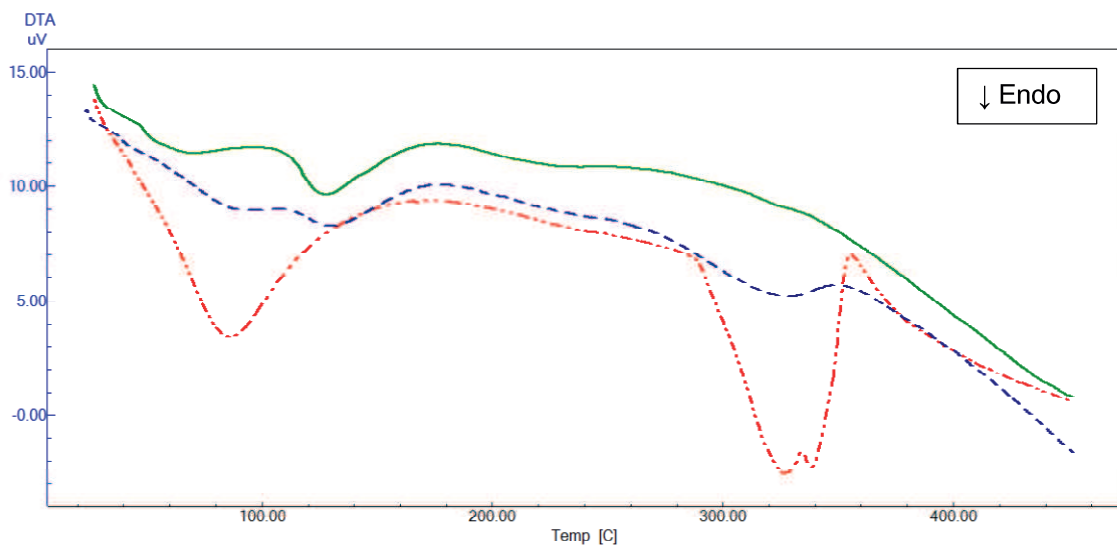


Tabela 15: Dados DTA referentes aos processos de transição de fases do ENGG, excipientes e mistura binária produzidas com o ENGG + sorbitol.

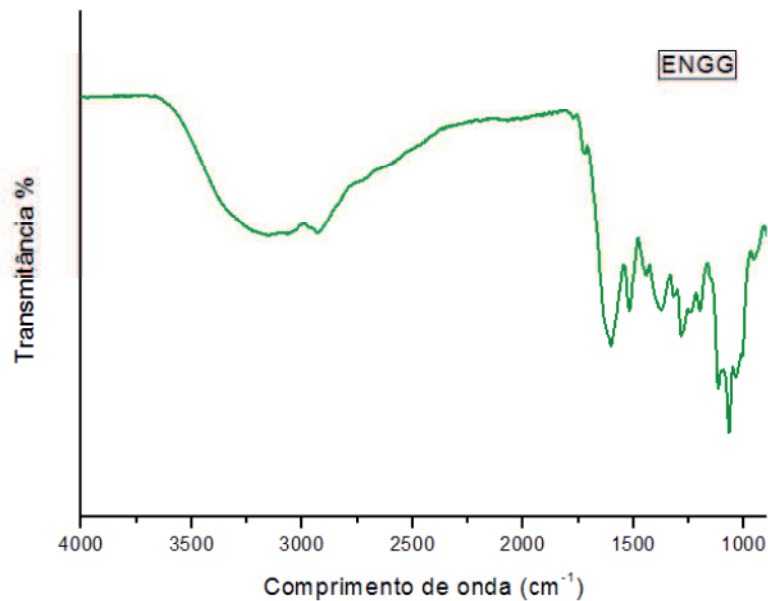
Amostras	Picos de decomposição	Pico (°C)	Onset (°C)	Calor (J/g)
ENGG	Primeiro	69,70	47,66	-25,85
	Segundo	127,87	112,47	-110,88
	Terceiro	238,20	192,24	-10,89
Sorbitol	Primeiro	86,44	54,62	-515,30
	Segundo	326,69	298,00	-530,95
Mistura 1:1	Primeiro	129,40	115,94	-42,92
	Segundo	330,08	287,13	-71,75

Com bases nos resultados apresentados sugere-se que, nas condições analisadas, o sorbitol apresentou melhor comportamento térmico perante o ENGG, não provocando alterações relevantes que possam interferir na estabilidade desse extrato nebulizado. Portanto, o sorbitol foi o excipiente farmacêutico escolhido para compor a formulação do enxaguatório bucal como agente umectante.

5.1.15 Perfil espectroscópico na região do infravermelho

No espectro de infravermelho relativo ao ENGG (Figura 21), é possível verificar uma banda larga em 3.651cm^{-1} que sugere um evento característico do estiramento de hidroxilas (O-H) em compostos fenólicos e ácidos carboxílicos, da existência de água na amostra e ainda, o estiramento de ligações carbono-hidrogênio (C-H), típica da natureza orgânica do extrato. A banda apresentada em 1.600cm^{-1} está relacionado ao estiramento de carbonilas (-CO-) e são sugestivos de uma grande variedade de metabólitos, como flavonoides e taninos, entre outros. A banda de forte intensidade, com 1.066cm^{-1} sugere a presença de silicatos (Si-O), tendo em vista que esse grupamento químico absorve na região entre 900 e 1.100cm^{-1} e que durante o processo de secagem por aspersão, utilizou-se o Aerosil® como adjuvante farmacotécnico.

Figura 21: Espectro de Infravermelho referente ao ENGG.



As bandas demonstradas no espectro do ENGG são concordantes com o fato desse ser formado por uma alta variabilidade de compostos orgânicos com diferentes grupamentos funcionais. Os mais esperados, conforme a composição do extrato, seriam ligações entre carbono e hidrogênio, características de compostos orgânicos e compostos aromáticos, dada a grande variabilidade dos metabólitos secundários detectados no *screening* fitoquímico.

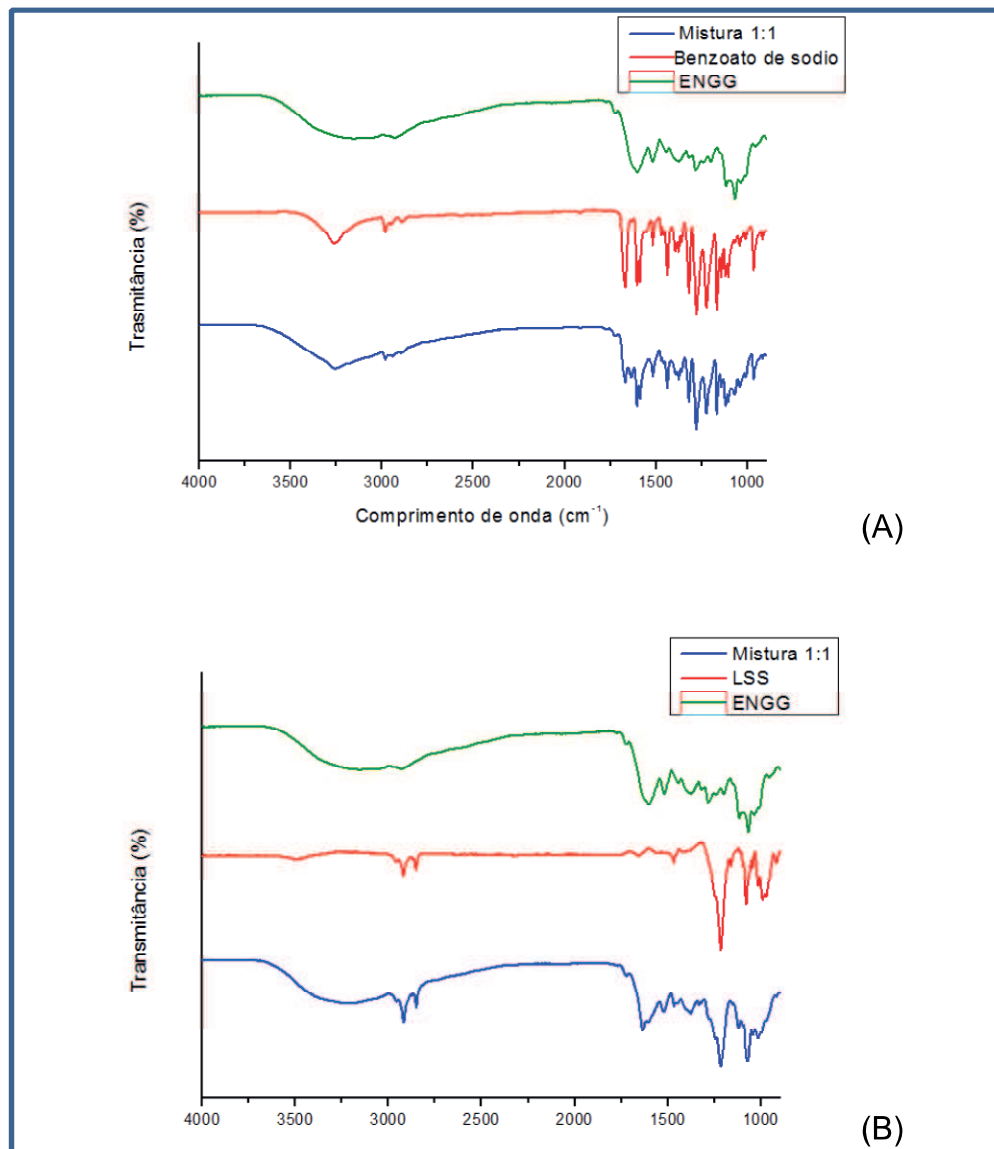
Dados semelhantes a este estudo foram encontrados em espécies vegetais do semiárido nordestino. Souza (2012) analisou o extrato nebulizado de cladódios de *Opuntia ficus-indica* (L.) Mill., e encontrou em 3.210 cm^{-1} , uma deformação axial de hidroxila, cuja presença é possivelmente justificada pela presença de água na amostra; uma absorção em 1602 cm^{-1} que refere-se à deformação angular da água e um pico de alta intensidade oriundo da formação de silicatos. Fernandes et al. (2012) ao avaliar os espectros do extrato seco de *Schinopsis brasiliensis* Engler.; verificou a presença de picos característicos de carbono-hidrogênio (2.800 cm^{-1}) e de carbono-oxigênio ($1.300\text{-}1.000\text{ cm}^{-1}$), atestando assim, a existência de fitoconstituintes, como por exemplo: taninos, alcaloides e flavonoides.

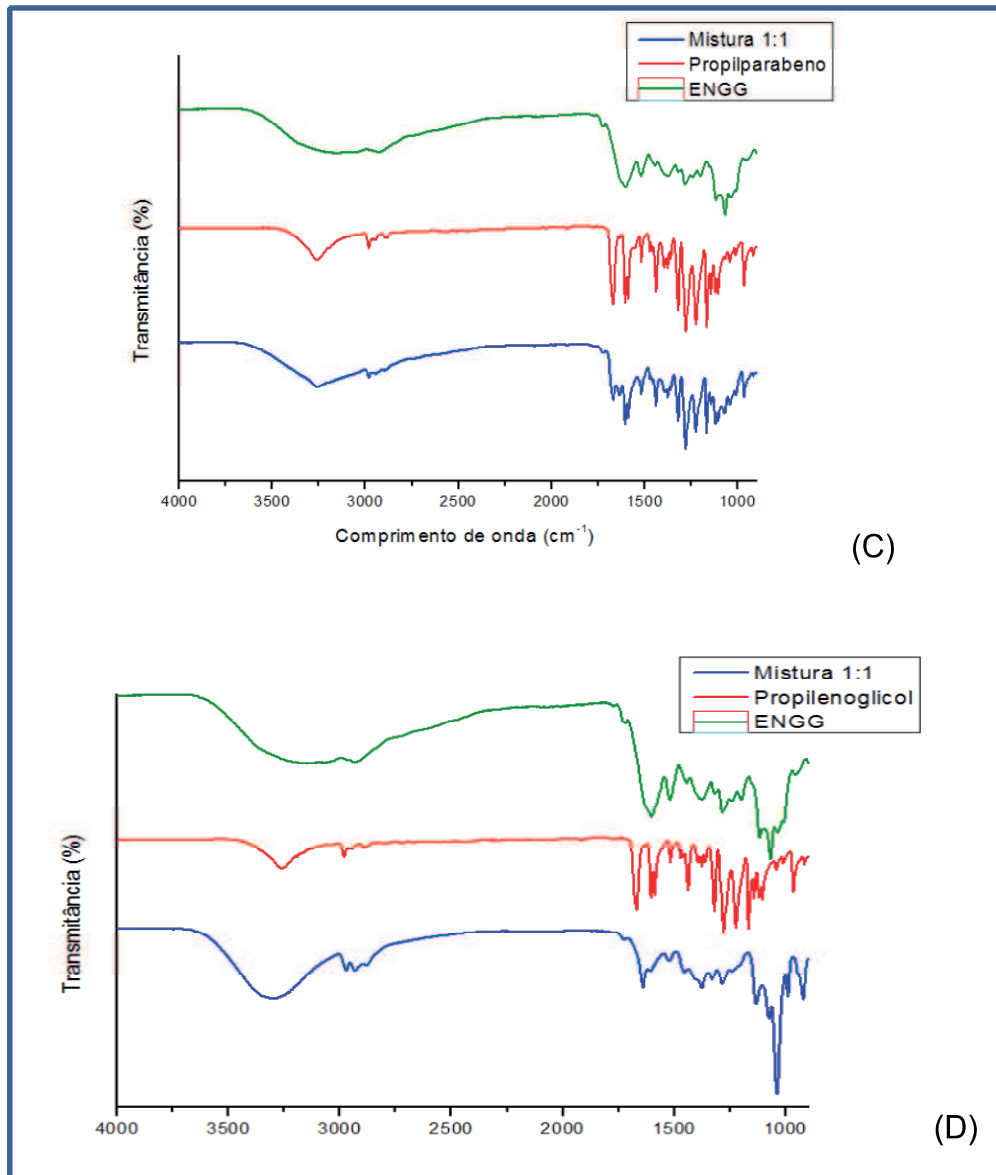
No tocante às misturas entre excipiente e ingrediente ativo, como também na análise termoanalítica (DTA), os espectros de FTIR de cada componente são considerados um importante aliado na detecção de possíveis interações (TITA et al., 2011). Na mistura com o propilparabeno todas as bandas características do extrato

e do adjuvante farmacêutico apresentaram-se de forma coerente, não existindo evidências de alterações de grupos funcionais. O mesmo foi constatado para a mistura com lauril sulfato de sódio, sorbitol (Figura 22).

No entanto, a mistura com benzoato de sódio, ocorre uma modificação quanto à banda relativa às hidroxilas, além do encurtamento de bandas relacionadas à ligações do tipo carbono-hidrogênio, detectando assim a ocorrência de interações químicas. Para o propilenoglicol, percebe-se uma modificação na banda relativa às hidroxilas e um aumento de intensidade na banda de 1.038cm^{-1} que está relacionada com ligações do tipo carbono-hidrogênio, demonstrando assim a existência de interações químicas.

Figura 22: Espectros no infravermelho relativos às misturas 1:1 (azul) do ENGG (verde) com os excipientes farmacêuticos (vermelho): Benzoato de sódio (A), Lauril sulfato de sódio (B) e Propilparabeno (C) e Propilenoglicol (D).





5.1.16 Desenvolvimento do enxaguatório bucal

Os excipientes empregados no desenvolvimento dos três lotes do enxaguatório bucal foram selecionados a partir dos resultados das técnicas termoanalíticas e de FTIR, sendo eleitos: o lauril sulfato de sódio (tensoativo), o propilparabeno (conservante) e o sorbitol (umectante). O mentol (flavorizante) não sofreu análise de compatibilidade, visto que a quantidade utilizada é considerada irrelevante no que se refere ao surgimento de interações químicas consideráveis. Com esses excipientes e o ENGG foram manipuladas os Lotes 1, 2 e 3; que foram submetidas à análise de controle de qualidade em duplicatas.

Após 24 horas, pode-se observar que lotes manipulados apresentaram um aspecto normal (Tabela 16), ou seja, não houve segregação de fases e tão pouco surgiu turvação. Pode-se relatar que a ausência desses parâmetros foi influenciada pela baixa concentração de tensoativo e umectante utilizados. Quanto à cor e odor, todos os lotes exibiram um grau de normalidade.

Tabela 16: Parâmetros avaliados após 24 horas de formulação do enxaguatório bucal.

	Caracteres organolépticos			Média ± DP	
	Aspecto	Cor	Odor	pH	Viscosidade
Lote 1	N	N	N	5,695±0,007	1,29±0,014
Lote 2	N	N	N	5,69±0,014	1,295±0,007
Lote 3	N	N	N	5,695±0,007	1,29±0,014

Legenda: N = normal

O pH após 24 horas (Tabela 16) manteve-se dentro da faixa recomendada pela Associação Brasileira de Odontologia - ABO (1990), que estabelece um valor superior a 5,50. O pH dos lotes 1,2 e 3 apresentaram um valor médio de 5,695±0,007, 5,69±0,014 e 5,695±0,007, respectivamente, sendo ainda concordante com o pH obtido para o extrato bruto que foi caracterizado como fracamente ácido. O pH fracamente ácido inibe a fermentação e a redução do metabolismo do biofilme (HELLWING e LUSSI, 2006). Em correlação com este estudo, Zanin et al., (2007), ao desenvolver um enxaguatório bucal com extrato hidroalcoólico de *Salvia officinalis* L. obteve uma formulação com pH, após 24 horas, igual a 6,30 (fracamente ácido).

Estudos evidenciam que o poder erosivo de uma substância não pode ser atribuído exclusivamente ao pH, visto que, a viscosidade e teor de sais devem ser considerados como fatores predisponentes (LIMA et al., 2005).

Os valores encontrados na análise da viscosidade, após 24 horas para os lotes manipulados, podem ser observados na Tabela 16. A resistência ao escoamento é uma propriedade importante nos colutórios, devido à sua capacidade de adesão à superfície dentária. Nesta avaliação, os lotes 1, 2 e 3 apresentaram um valor médio de 1,29±0,014, 1,295±0,007 e 1,29±0,014mm²/s, respectivamente. Não foram encontrados estudos desta propriedade físico-química em enxaguatórios bucais derivados de plantas medicinais.

Após os lotes serem submetidas a técnicas que avaliam a sua estabilidade, tais como a centrifugação e o estresse térmico, observou-se discretas modificações.

Nos parâmetros avaliados após a centrifugação (Tabela 17), verificou-se que o aspecto e a cor do Lote 2 foi levemente separado e levemente modificado, respectivamente. As respectivas médias para os Lotes 1, 2 e 3 foi de $5,69\pm 0,014$, $5,70\pm 0,014$ e $5,695\pm 0,007$, para o pH e a viscosidade foi estabelecido em $1,31\pm 0,014$, $1,325\pm 0,007$ e $1,31\pm 0,014$, não havendo uma diferença relevante nos resultados obtidos.

Tabela 17: Resultados dos parâmetros avaliados após centrifugação das formulações.

	Caracteres organolépticos			Média \pm DP	
	Aspecto	Cor	Odor	pH	Viscosidade
Lote 1	N	N	N	$5,69\pm 0,014$	$1,31\pm 0,014$
Lote 2	LS	LM	N	$5,70\pm 0,014$	$1,325\pm 0,007$
Lote 3	N	N	N	$5,695\pm 0,007$	$1,31\pm 0,014$

Legenda: N = normal
LS = levemente sedimentado
LM = levemente modificado

A avaliação dos lotes após estresse térmico, nas temperaturas de 40,50 e 60°C, estão reunidas na tabela 18, onde pode-se verificar que em relação as características organolépticas, o Lote 1 apresentou-se levemente modificada no seu cheiro diante da temperatura de 60°C. O lote 2 apresentou no seu aspecto, nas temperaturas de 50 e 60°C, uma leve separação; e sob essas temperaturas ocorreu também uma leve modificação em relação a sua cor. O odor do lote 2 indicou uma leve modificação para a temperatura de 60°C. O lote 3 apresentou apenas uma leve modificação do seu cheiro diante de uma temperatura de 60°C.

Tabela 18: Resultados dos parâmetros avaliados após estresse térmico.

	Caracteres organolépticos									Média \pm DP					
	aspecto			cor			odor			pH			Viscosidade		
	40	50	60	40	50	60	40	50	60	40	50	60	40	50	60
L1	N	N	N	N	N	N	N	N	LM	$5,66\pm 0,014$	$5,65\pm 0,014$	$5,66\pm 0,014$	$1,27\pm 0,014$	$1,29\pm 0,014$	$1,29\pm 0,014$
L2	N	LS	LS	N	LM	LM	N	N	LM	$5,67\pm 0,014$	$5,68\pm 0,014$	$5,66\pm 0,014$	$1,28\pm 0,021$	$1,31\pm 0,014$	$1,29\pm 0,014$
L3	N	N	N	N	N	N	N	N	LM	$5,68\pm 0,014$	5,66	$5,68\pm 0,028$	$1,29\pm 0,014$	$1,28\pm 0,01$	$1,30\pm 0,01$

Legenda: N = normal
LS = levemente separado
LM = levemente modificado

Com relação ao pH e a viscosidade, os lotes não apresentaram uma variação relevante.

Estabelecer um estudo comparativo sobre Controle de Qualidade de Fitoterápicos corresponde a uma tarefa difícil, uma vez que são escassos os trabalhos que demonstrem ensaios de estabilidade para enxaguatórios bucais desenvolvidos a partir de produtos vegetais.

5.1.17 Análise térmica da formulação final

A análise da formulação final através da DTA (figura 23) demonstra que a formulação apresentou um processo térmico com pico endotérmico acentuado na temperatura de 96,62°C ($\Delta H = -3,16$ J/g) (Tabela 19), que sugere a perda de água da amostra, sendo este elemento o solvente desta solução de uso odontológico.

Além disso, de acordo com a curva obtida para o enxaguatório bucal pode-se sugerir a volatilização de compostos químicos, uma vez que a amostra vegetal apresentou uma rica variabilidade de seus fitoconstituintes, como taninos e flavonóides (SANTOS, 2013; SOUZA, 2012).

Figura 23: Curva de DTA do enxaguatório bucal.

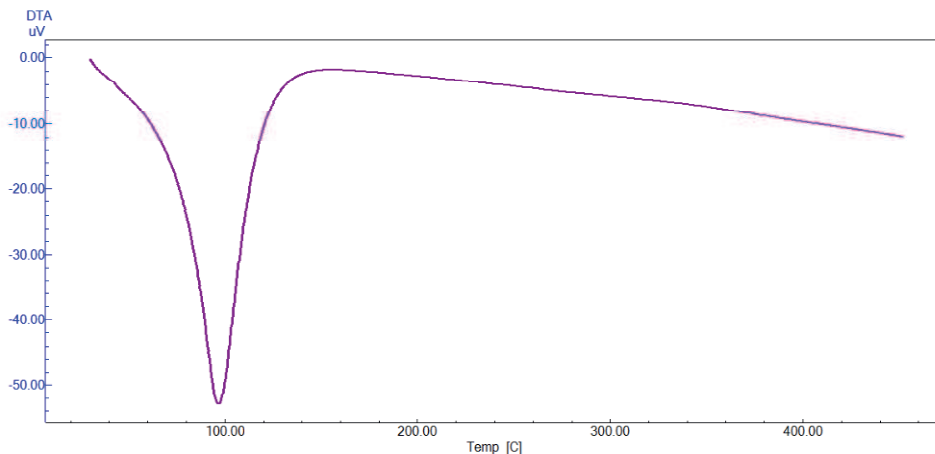


Tabela 19: Dados DTA referentes aos processos de transição de fases do enxaguatório bucal.

Picos de decomposição	Pico (°C)	Onset (°C)	Calor (J/g)
Primeiro	96,62	75,04	-3,13

5.1.18 Avaliação da atividade antimicrobiana do enxaguatório bucal

O enxaguatório bucal desenvolvido com o ENGG foi submetido à análise de atividade antimicrobiana frente aos microrganismos que compõem este estudo, onde verificou-se os resultados indicados na Tabela 20.

Tabela 20: Determinação de Concentração Inibitória Mínima (CIM) e Concentração Bactericida Mínima (CBM) do ENGG.

Microrganismo	CIM (µL/mL)	CBM (µL/mL)
<i>Streptococcus mutans</i>	25,00	25,00
<i>Streptococcus salivarius</i>	12,50	25,00
<i>Streptococcus parasanguinis</i>	Resistente	Resistente
<i>Streptococcus oralis</i>	6,25	12,50
Controle positivo	< 1,00	< 1,00

O enxaguatório bucal apresentou de acordo com os parâmetros de Holetz et al. (2002), uma forte atividade contra os patógenos *S. mutans* (25,0 e 25 µL/mL), *S. salivarius* (12,5 e 25 µL/mL) e *S. oralis* (6,25 e 12,5 µL/mL) e o *S. parasanguinis* foi resistente. Este resultado foi concordante com o ensaio de atividade antimicrobiana para o ENGG, onde os *S. oralis*, *S. salivarius*, *S. mutans* foram sensíveis, enquanto que o *S. parasanguinis* foi resistente. Observa-se ainda que o extrato bruto possui maior atividade do que a formulação farmacêutica, e esse fenômeno pode ser justificado pela presença dos excipientes contidos na formulação.

A avaliação da atividade antibacteriana da formulação farmacêutica obteve resultando concordante com o resultado obtido para o extrato bruto, onde obteve-se excelentes resultados de atividade antimicrobiana contra *S. mutans*, que constitui o principal patógeno envolvido com a formação do biofilme dental.

Moreira et al (2012) observou em seu estudo de desenvolvimento de um enxaguatório bucal com *Malva silvestres* que tanto o seu extrato etanólico quanto o seu enxaguatório bucal possuíam ação antimicrobiana sobre o *S. mutans*, demonstrando a sua eficácia no combate as patologias orais.

Diante do exposto, o enxaguatório bucal obtido a partir do ENGG representa uma excelente alternativa fitoterápica contra patógenos orais que estão envolvidos com a formação do biofilme dentário.

6 CONCLUSÕES

Com os resultados obtidos nesse experimento, pode-se concluir que:

Os metabólitos secundários encontrados no extrato vegetal podem conferir ação antimicrobiana, o que serve de justificativa para a sua utilização na medicina popular e no desenvolvimento de formulações farmacêuticas;

Quanto à toxicidade determinada em *Artemia salina*, sugere que o extrato apresenta uma moderada toxicidade;

O ENGG apresentou forte atividade antimicrobiana para três dos quatro microrganismos testados;

As análises dos parâmetros físico-químicas demonstraram que o ENGG é um pó fino, característico do processo de secagem pelo qual foi obtido, porém, em análise ao microscópio óptico não foi possível medir área, circunferência, raio e diâmetro devido a sua natureza altamente hidrocópica; apresenta ainda, baixa densidade, pH fracamente ácido e a perda por dessecação encontra-se inserido dentro do patamar recomendado pela Farmacopeia Brasileira V (2010);

A busca pela detecção de interações, através das técnicas de DTA e FTIR, entre o ENGG e os adjuvantes elencados na formulação, demonstraram que algumas misturas provocaram antecipação da decomposição do extrato ou o seu retardamento, enquanto outros mantiveram um perfil físico-químico, não sendo responsável por nenhum tipo de interação a exemplo do propilparabeno (conservante), lauril sulfato de sódio (tensoativo) e o sorbitol (umectante) que mostraram melhor comportamento nas técnicas químicas com o ENGG, foram os escolhidos para compor as formulações do enxaguatório bucal;

Os valores dos lotes manipulados mantiveram-se dentro dos padrões recomendados pela Associação Brasileira de Odontologia;

Em relação à cor e odor todos os lotes apresentaram um padrão normal após 24 horas e no final do teste de centrifugação e estresse térmico;

O teste de viscosidade mostrou que os enxaguatórios bucais apresentaram a relação adequada: menor valor de pH, deverá preferencialmente ter um menor índice de viscosidade, conforme preconiza a ABO;

O enxaguatório bucal apresentou uma forte atividade antimicrobiana, sendo uma excelente alternativa para o controle e prevenção do biofilme dentário.

7 PROPOSTAS FUTURAS

- Quantificar os compostos fenólicos;
- Refazer as curvas de TG e DTA em diferentes razões de aquecimento;
- Realizar um estudo de toxicidade in vivo em camundongos;
- Realizar estudo clínico.

REFERÊNCIAS

AGARIE, S.; KAWAGUCHI, A.; KODERA, A.; SUNAGAWA, H.; KOJIMA, H.; NOSE, A.; NAKAHARA, T. Potential of the commonice plant, *Mesembryanthemum crystallinum* as a newhigh-functional food as evaluated by polyol accumulation. **Plant Prod. Sci.** 12(1), 37-46, 2009.

AIGNER, Z.; BERKESI, O.; FARKAS, SZAVÓ-RÉVÉZS, P. DSC, X-ray and FTIR studies of a gemfibrozil/dimethyl- β -cyclodextrin inclusion complex produced by cogrinding. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical analysis**, v. 57, p. 62-67, 2012.

ALBUQUERQUE, U. P. Re-examining hypotheses concerning the use and knowledge of medicinal plants: a study in the Caatinga vegetation of NE Brasil. **Journal of Ethnobiology and Ethnomedicine**, v. 2, n. 30, p. 1-10, 2006.

ALBUQUERQUE, U. P.; HANAZAKI, N. As pesquisas etnodirigidas na descoberta de novos fármacos de interesse médico e farmacêutico: fragilidades e perspectivas. **Revista Brasileira de farmacognosia**, p. 678-689, Dez., 2006.

ALBUQUERQUE, U. P.; MEDEIROS, P. M.; ALMEIDA, A. L. S.; MONTEIRO, J. M.; LINS NETO, E. M. F.; MELO, J. G.; SANTOS, J. P. Medicinal plants of the caatinga (semi-arid) vegetation of NE Brazil: a quantitative approach. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 114, n. 3, p. 325-354, 2007.

ALMEIDA, R. B. A.; CARRETTO, C. F. P.; SANTANA, R. S.; FURLAN, M. R.; JUNQUEIRA, J. C.; JORGE, A. O. C. atividade antimicrobiana de *Cymbopogon citratus* (DC.) stapf sobre *Candida* spp. **Revista de Odontologia da UNESP**, n. 37, v. 2, p. 147-153, 2008.

ALVES, P. M.; QUEIROZ, L. M. G.; PEREIRA, J. V.; PEREIRA, M. S. V. Atividade antimicrobiana, antiaderente e antifúngica de plantas medicinais brasileiras sobre microorganismos do biofilme dental e cepas do gênero *Cândida*. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 42, n. 2, p. 222-224, 2009.

ALVES, P. M.; QUEIROZ, L. M. G.; PEREIRA, J. V.; PEREIRA, M. S. V. Atividade antimicrobiana, antiaderente e antifúngica *in vitro* de plantas medicinais brasileiras sobre microrganismos do biofilme dental e cepas do gênero *Candida*. **Revista da sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 42, n.2, p. 222-224, 2009.

APPEL, G.; REUS, M. **Formulações aplicadas a odontologia**. Editora Ravine, segunda edição, p. 607, 2005.

AQUINO, F. G.; WALTER, B. M. T. RIBEIRO, J. F. Espécies vegetais de uso múltiplo em reservas legais do cerrado – Bolsas, MA. **Revista Brasileira Biociências**, v. 5, supl. 1, p. 147-149, 2007.

- ARAÚJO, C. R. F.; PEREIRA, J. V.; PEREIRA, M. S. V.; ALVES, P. M.; HIGINO, J. S.; MARTINS, A. B. Concentração Mínima Bactericida do Extrato do Cajueiro sobre Bactérias do Biofilme Dental. **Pesquisa Brasileira em Odontopediatria e Clínica Integrada**, v.9, n.2, p. 187-191, 2009.
- ARAÚJO, E. L.; SILVA, K. A.; FERRAZ, E. M. N.; SAMPAIO, E. V. S. B.; SILVA, S. I. Diversidade de herbáceas em microhabitats rochoso, plano e ciliar em uma área de caatinga, Caruaru, PE, Brasil. **Acta bot. Bras.**, v. 19, n.2, p. 285-294, 2005.
- ARAÚJO, F. S.; MARTINS, F. F.; SHEPHERD, G. J. Variações estruturais e florísticas do carrasco no planalto da Ibiapaba, Ceará. **Revista Brasileira Biologia**, v. 59, n. 4, p. 663-678, 1999.
- ARAÚJO, T. K. **Avaliação *in vitro* do potencial antimicrobiano e da atividade antiproliferativa da *guapira graciliflora* Mart. (João Mole)**. 2014. 77f. Dissertação – Universidade Estadual da Paraíba, Campina Grande – PB, 2014.
- ASADOORIAN, J. CDHA position paper on commercially available over-the – counter oral nursing products. **Canadian Journal of dental hygiene (CJDH)**, v. 40, n. 4, jul./aug., 2006, p. 01-13.
- Associação Brasileira de Odontologia – ABO. **Dentifrício**. Norma ABO nº 1, 1990.
- BERNAL, C.; COUTO, A. B.; BREVIGLIERI, S. T.; CAVALHEIRO, E. T. G. Influência de alguns parâmetros experimentais nos resultados de análises calorimétricas diferenciais-DSC. **Química Nova**, v. 25, n. 5, p. 849-855, 2002.
- BOLIGON, A. A.; FELTRIN, A. C.; JANOVIK, V.; FROHLICH, J. K.; ATHAYDE, M. L. Estudo fitoquímico das cascas do tronco de *Scutia buxifolia* Reissek, **Saúde**, v. 35, n.2, 2009.
- BORCHARDT, R. T. Value of Pharmaceutical Sciences. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 16, p. 1387-1401, 1998.
- BRASIL. Ministério do Meio Ambiente. **Avaliação de ações prioritárias para a conservação da biodiversidade da Caatinga**. Brasília, 2002.
- BRASIL, Ministério da Saúde. Portaria nº 971, de 3 de maio de 2006. **Dispõe obre Política nacional de Práticas Integrativas e Complementares no Sistema Único de Saúde**. Brasília: Secretaria Nacional de Vigilância Sanitária, 2006a.
- BRASIL, Ministério da Saúde. Decreto nº 5813, de 22 de junho de 2006. **Dispõe sobre a Política Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos e dá outras providências**. Brasília: Secretaria Nacional de Vigilância Sanitária, 2006b.
- BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Guia de controle de qualidade de produtos cosméticos**. Segunda edição, Brasília, 120p. 2008.

- BRIGHENTI, F. L.; GAETTI-JARDIM JR.; E.; DANELON, M.; EVANGELISTA, G. V.; DELBEM, A. C. B. Effect of *Psidium cattleianum* leaf extract on enamel demineralisation and dental biofilm composition in situ. **Archives of oral biology**, v. 57, p. 1034-1040, 2012.
- BRITTO, A. C. A. et al. *In vitro* and *in vivo* antitumor effects of the Essential Oil from the Leaves of *Guatteria friesiana*. **Planta Medica**, v. 78, n. 5, p. 409-414, 2012.
- BUGNO, A. N. et al. Enxaguatórios bucais: avaliação da eficácia antimicrobiana de produtos comercialmente disponíveis. **R. Inst. Adolfo Lutz**, São Paulo, v. 65, n. 1, p. 40-45, 2006.
- CARELLI, G.; MACEDO, S. M. D.; VALDUGA, A. T.; CARAZZA, M. L.; OLIVEIRA, J. V.; FRANCESCHI, E.; VIDAL, R. JASKULSKI, M. R. Avaliação preliminar da atividade antimicrobiana do extrato de erva-mate (*Ilex paraguariensis* A. St. – Hil.) obtido por extração com CO₂ supercrítico. **Revista Brasileiro de Plantas Mediciniais**, v. 13, n.1, p. 110-115, 2011.
- CARTAXO, S. L.; SOUZA, M. M. A.; ALBUQUERQUE, U. P. Medicinal plants with bioprospecting potential used in semi-arid northeastern Brazil. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 131, n.2, p. 326-342, 2010.
- CAVALCANTI, A. L.; MENESES, R. O.; SILVA, K. F.; SÁ, S. C. V. L.; ALMEIDA, L. F. D.; CASTRO, R. D. atividade antifúngica *in vitro* de enxaguatórios bucais sobre *Candida spp*. **Revista de Odontologia da UNESP**, v. 38, n. 5, p. 313-317, 2009.
- CEOLIN, T. et al. Medicinal plants: knowledge transmission in families of ecological farmers in souther Rio Grande do Sul. **Rev Esc Enferm USP**, v. 45, n.1, p. 47-54, 2011.
- CHAVES, J. S.; COSTA, F. B.; FREITAS, L. A. P. Development of enteric coated tablets from spray dried extract of feverfew (*Tanacetum parthenium* L.). **Brasilian Journal Pharmaceutical Science**, v. 45, n.3, p. 573-584, 2009.
- CHAVES, T. P. et al. Seasonal variation in the production of secondary metabolites and antimicrobial activity of two plant species used in Brazilian traditional medicine. **Afr. J. Biotechnol**, v. 12, n. 8, p. 847-853, feb 2013.
- CHAVES, T. R. **Variação sazonal na produção de metabolitos secundários e na atividade antimicrobiana de espécies vegetais do semi-árido brasiscilo**. UEPB, Campina Grande – PB, 2013.
- CHEON, K. et al. Characteristics of *Streptococcus mutans* genotypes and dental caries in children. **Eur J Oral Sci**, v. 121, n. 31, p. 148-155, 2013.
- CHIENG, N.; RADES, T.; AALTONEN, J. an overview of recent studies on the analysis of pharmaceutical polymorphs. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 55, p. 618-644, 2011.

CLSI. Clinical and Laboratory Standards Institute. **Normas de Desempenho para Testes de Sensibilidade Antimicrobiana**: 15º Suplemento Informativo, v. 25, n. 1, 2005.

CLSI. **Reference Method for Broth Dilution Antifungal Susceptibility Testing of yeasts**. Third informational Supplement. Wayne, PA: CLSI document M27-A3. Clinical and Laboratory Standards institute, 2008.

CLSI. Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bactéria that grow aerobically approved standard. 8 ed. CLSI document M07-A8. **Clinical and Laboratory Standards Institute**, v. 29, p. 9-49, 2009.

COELHO, F. B. R.; DAL BELO, C. A.; LOLIS, S. F., SANTOS, M. G. Levantamento etnofarmacológico realizado na comunidade Mumbuca localizada no Jalapão – TO. **Revista Eletrônica de Farmácia**. Suplemento v. 2, n. 2, p. 52-55, 2005.

CORDEIRO, C. H. G.; SACRAMENTO, L. V. S.; CORRÊA, M. A.; PIZZOLITTO, A. C.; BAUAB, T. M. Análise farmacognóstica e atividade antibacteriana de extratos vegetais empregados em formulação para a higiene bucal. **Revista Brasileira de ciências Farmacêuticas**, v. 42, n. 3, p. 395-404, 2006.

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

COSTA, A. C. B. P.; PEREIRA, C. A.; FREIRE, F.; JUNQUEIRA, J. C.; JORGE, A. O. C. Atividade antifúngica dos extratos glicólicos de *Rosmarinus officinalis* Linn e *Syzygium cumini* Linn. sobre cepas clínicas de *Candida albicans*, *Candida glabrata* e *Candida tropicalis*. **Revista de Odontologia da UNESP**, v. 38, n.2, p. 111-116, 2009.

COSTA, J. G. M. et al. Biological screening of Araripe basin medicinal plants using *Artemia salina* Leach and pathogenic bacteria. **Pharmacogn Mag**, v. 6, n. 24, p. 331-334, 2010.

COUTINHO, H. D. M.; BEZERRA, D. A. C.; LOBO, K.; BARBOSA, D. J. E. **Atividade antimicrobiana de produtos naturais**. Julho de 2003/junho de 2004, p. 78-85.

CRAGG, G. M.; GROTHAUS, P. G.; NEWMAN, D. J. New Horizons for Old Drugs and drug Leads. **Journal of Natural Products**, v. 77, p. 703-723, 2014.

DALE, J. W.; PARK, S. F. **Molecular Genetics of bacteria**. 4.ed. Chichester-England: John Wiley & Sons Ltd. 2004.

DARSINI, T. P.; SASIKUMAR, J. M.; KULANDHAIVEL, M. in Vitro Antioxidant and Cytotoxic Analysis of *Boerhaavia diffusa* Linn. **Ethnobotanical Leaflets**, v. 13, p. 263-68, 2009.

DENARDI, B. B. O uso da clorexidina na prática odontológica. **Revista da Associação Paulista de Cirurgiões Dentistas**, v. 48, n. 2, p. 1279-84, 1994.

DINIZ, D. N.; MACÊDO-COSTA, M. R. PEREIRA, M. S. V. PEREIRA, J. V.; HIGINO, J. S. Efeito antifúngico in vitro do extrato da folha e do caule de *Myrciaria cauliflora* berg. sobre microorganismos orais. **Revista de Odontologia da UNESP**, v. 39, n. 3, p. 151-156, 2010.

DRUMMOND, M. A. (Coord.). **Avaliação e identificação de ações prioritárias para a conservação, utilização sustentável e repartição de benefícios da biodiversidade do bioma da Caatinga**. Petrolina, 23. 2000.

DRUMOND, M. R. S.; CASTRO, R. D.; ALMEIDA, R. V. D.; PEREIRA, M. S. V.; PADILHA, W. W. N. Estudo comparativo *in vitro* da atividade antibacteriana de produtos fitoterápicos sobre bactérias cariogênicos. **Pesquisa brasileira em Odontopediatria e Clínica Integrada**, v. 4, n. 1, 2004, p. 33-38.

DZOYEM, J. P. Cytotoxic and antimicrobial activity of selected Cameroonian edible plants. **BMC Complement Altern Med**, v. 13, n.1, p. 78, 2013.

FARIAS, B. C.; ANDRADE, F. B. M.; GONDIM, V. M. L. SOARES, R. S. C.; GUSMÃO, E. S.; CIMÕES, R. Redução do índice de cálculo supragengival: dentifício anticálculo versus dentifício convencional. **Periodontia**, v. 21, n. 1, p. 44-59, 2011.

FARMACOPEIA BRASILEIRA. Quinta edição, editora Atheneu, 2010.

FONSECA, M. S.; SILVA JÚNIOR, M. C. S. fitossociologia e similaridade florística entre trechos de Cerrado sentido restrito em interflúvio e em vale no Jardim Botânico de Brasília, DF. **Acta bot. Bras.** V. 18, n. 1, p. 19-29, 2004.

FONTENELE, A. F. et al. Avaliação da Toxicidade de Extratos de Plantas Medicinais através de Bioensaios com *artemia salina*, Leach. **Ciência e cultura**. V. 40, n. 11, p. 09-11, 1988.

FRANÇA, I. S. X. et al. Popular medicine: benefits and drawbacks of medicinal plants. **Rev Bras Enferm.**, v. 61, n. 2, p. 201-8, Mar 2008.

FREIRES, I. A.; ALVES, L. A.; JOVITO, V. C.; ALMEIDA, L. F. D.; CASTRO, R. D.; PADILHA, W. W. N. Atividades antibacteriana e antiaderente *in vitro* de tinturas de *Schinus terebinthifolius* (Aroeira) e *Solidago microglossa* (Arnica) frente a bactérias formadoras do biofilme dentário. **Scientific Clinical Odontology**, v. 9, n. 2, p. 139-143, 2010.

FURLAN, A.; UDULUTSCH, R. G.; DIAS, P. Flora da Serra do cipó, Minas Gerais: Nyctginacea. **Boletim de Botânica da Universidade de São Paulo**, 26: 51-59, 2008.

GEBRAN, M. P.; GEBERT, A. P. O. Controle químico e mecânico de placa bacteriana. **Tuiuti: Ciência e Cultura**, Curitiba, n. 26, v. 3, p. 45-58, 2002.

GIL, E. S. controle físico-químico de qualidade de medicamentos. Editora Pharmabooks. Terceira edição, p. 509, 2010.

GINDRI, A. L.; SILVA, M.; MARCHI, M. B.; BRUM, L. S.; ATHAYDE, M. L.; HOELZEL, S. C.S. M. Análise fitoquímica das cascas e do miolo da raiz de *Urera Baccifera* (L.) Gaudich (Urticaceae). **Saúde (Santa Maria)**, v. 36, n. 2, p. 6370, 2010.

GIULIETTI, A. M.; CONCEIÇÃO, A.; QUEIROZ, L. P. **Diversidade e caracterização das fanerógamas do semi-árido brasileiro**. Recife: Associação Plantas do Nordeste, 2006. 488p.

GRUPTA, A. K.; RYDER, J. E.; COOPER, E. A. Naftinina: a review. **Journal of cutaneous Medicine and Surgery**, v. 12, n. 2, p. 51-58, 2008.

GUILFOILE, P. G. **Antibiotic-Resistant Bacteria**. New York: Chelsea House Publishers, 2007.

GUNSOLLEY, J. C. A meta-analysis of six-month studies of antiplaque and antigingivitis agents. **The Journal of the American Dental association**, v. 137, p. 1649-1657, 2006.

HE, X.; BAI, Y.; ZHAO, Z.; WANG, X.; FANG, J.; HUANG, L.; SENG, M., ZHANG, Q.; ZHANG, Y.; ZHENG, X. Local and traditional uses, phytochemistry, and pharmacology of *Sophora japonica* L.: A review. **J. Ethnopharmacol**, 187, 160-182, 2016.

HELLWIG, E.; LUSSI, A. Oral hygiene products and acidic medicines. **Monogr Oral Sci**, 20: 112-18, 2006.

HERRERA, A. H. et al. Susceptibility of Porphyromonas gingivalis and Streptococcus mutans to antibacterial effect from Mammea americana. **Adv Pharmac Scien**, v. 2014, p. 1-6, 2014.

HOFFMANN, C. H. **Dentifrícios em periodontia**. Monografia apresentada ao curso de Especialização em Periodontia, da Universidade Federal de Santa Catarina, como requisito para obtenção de título de Especialista em Períodontia. Prof^a. MSc. Ariadne Cristiane Cabral Cruz: Florianópolis, 2008.

HOGG, S. **Essential Microbiology**. Chichester – England: John Wiley & Sons Ltd. 2004.

HOLETZ, F. B. et al. Screening of some Plants Used in the Brazilian Folk Medicine for the Treatment of Infectious Diseases. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 97, n. 7, p. 1027-1031, 2002.

IBGE. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. **Cidades**. Disponível em: <http://www.ibge.gov.br/cidadesat/topwindow.htm?> Acesso em: 14/10/2004.

ISHNAVA, K. B.; CHAUHAN, J. B.; GARG, A. A.; THAKKAR, A. M. Antibacterial and phytochemical studies on *Calotropis gigantea* (L.) R. Br. Latex against selected cariogenic bacteria. **Saudi Journal of Biological Sciences**, v.19, p. 87-91, 2012.

JARDIM, P. S.; JARDIM, E. G. J. Influência da remoção mecânica da placa bacteriana associada ao uso diário de solução fluoretada. **RGO**, Porto Alegre, v. 46, n. 2, p. 79-84, abr/jun., 1998.

JAWETZ, E.; MELNICK, J. L.; ADELBERG, E. A. **Microbiologia médica**. 21. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1998.

JOVITO VC, ALMEIDA LFD, FERREIRA DAH, MOURA D, PAULO MQ, PADILHA WVN. Avaliação in vivo de Dentifrício Contendo Extrato da *Eugenia uniflora* L. (Pitanga) sobre Indicadores de Saúde Bucal. **Pesq Bras Odontoped Clin Integr**, 9(1): 81-86, 2009.

JYPTHI, K.S.; SESHAGIRI, M. In-vitro activity of saponins of *Bauhinia purpurea*, *Madhuca longifolia*, *Celastrus paniculatus* and *Semecarpus anacardium* on selected oral pathogens. **J. Dent (Tehran)**, v.9, n.4, p. 216-223, 2012.

KAISOON, O.; SIRIAMORNUN, S.; WEERAPREEYAKUL, N.; MEESO, N. Phenolic compounds and antioxidant activities of edible flowers from Thailand. **Journal of Functional Foods**, v. 3, p. 88-99, 2011.

KOES, R. E., QUATTROCCHIO, F., & MOL, J. N. M. The flavonoid biosynthetic pathway in plants: Function and evolution. **Bio Essays**, v. 16, n. 2, p. 123-132. 2005.

LACHMAN, L.; LIEBERMAN, H. A.; KANING TEORIA, J. L. **Teoria e prática na indústria farmacêutica**. Editora Fundação Calouste Gulbenkian, v. 1, 2001.

LAVOR, E. P.; NAVARRO, M. V. M.; FREIRE, F. D.; ARAGÃO, C. F. S.; RAFFIN, F. N.; BARBOSA, E. G.; LIMA e MOURA, T. F. A. Application of thermal analysis to the study of antituberculosis drugs—excipient compatibility. **Journal of Thermal Analysis and Calorimetry**. 115 p.2303–2309, 2014.

LEAL, I.R.; TABARELLI, M.; SILVA, M. C. da. Ecologia e conservação da Caatinga: uma introdução ao desafio. In: LEAL, I. R.; TABARELLI, M.; SILVA, J. M. C. (Eds.) **Ecologia e conservação da caatinga**. Recife: editora Universitária UFPE, 2003.

LEIVA, C. R. M.; CRNKOVIC, P. M.; DOS SANTOS, A. M. O emprego da termogravimetria para determinar a energia de ativação do processo de combustão de óleos combustíveis. **Química Nova**, v. 29, n. 5, p. 940, 2006.

LIMA, A.L.; VALENÇA, A.M.G.; ALBUQUERQUE, F. R.; SILVA, N. B. Análise do pH e da Viscosidade de Enxaguatórios Bucais Fluoretados Disponíveis Comercialmente na cidade de João Pessoa – PB. **Pesq. Bras. Odontoped Clin. Integr.**, 5 (3): 223-8, 2005.

LORENZI, H. **Árvores brasileiras**. 2 ed. Nova Odessa, São Paulo: Editora Plantarum, 1998. Vol. II.

LORENZO, J. L. Placa (biofilme) dental. In _____. **Microbiologia para o estudante de Odontologia**. São Paulo: Atheneu, 2014, p. 73-85.

LUNA, J. S.; LIMA, M. R.; OMENA, M. C.; MENDONÇA, F. A.; BIEBER, L. W.; SANT'ANA, A. E. N. A study of the larvicidal and molluscicidal activities of some medicinal plants from northeast Brazil. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 97, p. 199-206, 2005.

MADIGAN, M. T.; MARTINKO, J. M.; PARKER, J. **Brock. Biología de los microorganismos**. 10. ed. Madrid: Pearson-Prentice Hall, 2003.

MARIMIN JUNIOR, B. H.; HARIDASAN, M. Comparação da vegetação arbórea e características edáficas de um cerrado e um cerrado sensu stricto em área adjacentes sobre solo distrófico no leste de Mato Grosso, Brasil. **Acta bot. Bras.**, v. 19, n. 4, p. 913-926, 2005.

MARREIRO, R. O. et al. Evaluation of the stability and antimicrobial activity of an ethanolic extract of *Libidibia férrea*. **Chinical, Cosmetic and Investigational Dentistry**, v. 2014, n. 6, p. 9-13, 2014.

MEDEIROS, K. C.; MONTEIRO, J. C.; DINIZ, M. F. F. M.; MEDEIROS, I. A.; SILVA, B. A.; PIUVEZAM, M. R.; Effect of the activity of the Brazilian polyherbal formulation: *Eucalyptus globulus* Labill, *Peltodon radicans* Pohl and *Schinus terebinthifolius* Radd in inflammatory models. **Rev Bras Farmacogn.** 2007; 17 (1): 23-8.

MEDEIROS, A. C. D.; MEDEIROS, I. A.; MACÊDO, R. O. Thermal studies of *Albizia inopinata* crude extract in the presence of cyclodextrin and Aerosil by TG and DSC coupled to the photovisual system. **Thermochemica Acta**, v. 392-393, p. 93-98, 2002.

MEYER, B. N.; FERRIGNI, N. R.; PUTNAM, J. E.; JACOBSEN, L. B.; NICHOLS, D. E.; MCLAUGHLIN, J. L. Brine shrimp, a convenient general bioassay for active-plant constituents. **Planta Médica**, v. 45, p. 31-34, 1982.

MEYER, A. C. A.; TERA, T. M.; ETO, Y. **Manual odontológico de formulações manipuladas**. Editora Santos, p. 182, 2007.

MIMS, C.; PLAYFAIR, J.; ROITI, I.; WAKELIN, D.; WILLIAMS, R. **Microbiologia Médica**. 2. ed. Harcourt Brase. Barcelona, 1999.

MOAT, A. G.; FOSTER, J. W.; SPECTOR, M. P. **Microbial physiology**. 4. ed. New York: John Wiley & Sons Ltd. 2002.

MONFRIN, R. C. P.; RIBEIRO, M. C. Avaliação *in vitro* de antissépticos bucais sobre a microbiota da saliva. **Revista da Associação Paulista de Cirurgiões Dentistas**. São Paulo, v. 54, p. 400-407, set./out., 2010.

NIAZI, S. K. **Handbook of Preformulation: chemical, biological and botanical drugs**. Editora Informa HealthCare, 2007.

NUNES, K. M.; BARBOSA, W. L. R.; OZELA, E. F.; SILVA JUNIOR, J. O. C. Padronização da tintura de *Calendula officinalis* L. para seu emprego em formulações semi-sólidas fitoterápicas. **Latin American Journal of Pharmacy**, v. 28, n. 3, p. 344-350, 2009.

OLIVEIRA, D. V. A. **Variação na qualidade de folhas de *Guapira graciliflora* (Nyctaginaceae) ao longo do seu desenvolvimento e efeito na herbivoria**. Universidade de Brasília. Faculdade UnB Planaltina. 2013.

OLIVEIRA, G. L. et al. Plantas medicinais utilizadas na comunidade urbana de Muribeca, Nordeste do Brasil. **Acta Bot Bras**, v. 24, n. 2, p. 571-577, 2010.

OLIVEIRA, M. A.; YOSHIDA, M. I.; GOMES, E. C. L. Análise térmica aplicada a fármacos e formulações farmacêuticas na indústria farmacêutica. **Química Nova**, v. 34, n. 7, 2011.

OSAWA, T. Thermal analysis – review and prospect. **Thermochimica acta**, v. 355, p. 35-42, 2000.

OZÇELIK, B.; KARTAL, M.; ORHAN, I. Cytotoxicity, antiviral and antimicrobial activities of alkaloids, flavonoids, and phenolic acids. **Pharm. Biol.** 49 (4), 396-401, 2011.

PALANIVEL, M. G.; RAJKAPOOR, V.; SENTHIL KUMAR, R.; EINSTEIN, J. W.; KUMAR, E. P.; RUPESH KUMAR, M.; KAVITHA, K.; PRADEEP KUMAR, M.; JAYAKAR, B. Hepatoprotective and Antioxidant Effect of *Pisonia aculeate* L. against CCl₄ – Induced Hepatic Damage in Rats. **Sci Pharm**, v. 76, p. 203-215, 2008.

PERAZZO, M. F. et al. Antimicrobial effect of *Cymbopogon citratus* essential oil on dental biofilm-forming bacteria. **R Bras Ci Saúde**, v. 16, v. 4, p. 553-558, 2012.

PEREIRA, J. G.; OKUMURA, F.; RAMOS, L. A.; CAVALHEIRO, E. T. G.; NÓBREGA, J. A. Termogravimetria: um novo enfoque para a clássica determinação de cálcio em cascas de ovos. **Química Nova**, v. 32, n. 6, p. 1661-1666, 2009.

PRADO, D. E. As Caatingas da América do Sul. In: LEAL, I. R.; TABARELLI, M.; SILVA, J. M. C. (Eds.). **Ecologia e conservação da caatinga**. Recife: Editora Universitária UFPE, 2003.

PRESCOT, L. M.; HARLEY, J. P.; KLEIN, D. A. **Microbiology**. 5. ed. New York: McGraw-Hill Companies, Inc. 2002.

PRISTA, L. N.; ALVES, A. C. E.; MORGADO, R. M. R. **Técnica farmacêutica e farmácia galênica**. 4 ed. Lisboa: Fundação Calouste Gulbenkian, v.2, 1991.

RASHED, K.; BUTMARIU, M.; Antimicrobial and antioxidant Activities of *Bauhinia racemosa* Lam. And Chemical content. **Iran. J. Pharm. Res.** 13(3), 1073-1080, 2014.

ROCHA, E. L. S. S.; CARVALHO, A. V. O. R; ANDRADE, S. R. A.; MEDEIROS, A. C. D.; TROVÃO, D. M. B. M.; COSTA, E. M. M. B. Potencial antimicrobiano de seis plantas do semiárido paraibano contra bactérias relacionadas à infecção endodôntica. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada**, v.34,p. 351-355, 2013.

ROWE, R. C.; SHESKEY, P. J.; QUINN, M. E. **Handbook of Pharmaceutical Excipients**. Editora Pharmaceutical Press, 6.ed., p. 888, 2009.

SAMPAIO, E. V. S. B. Características e potencialidades. In: GARIGLIO, M. A.; SAMPAIO, E. V. S. B.; CESTARO, L. A.; KAGEYAMA, P. Y. **Uso Sustentável e Conservação dos Recursos Florestais da Caatinga**. Brasília: Serviço Florestal Brasileiro, 2010.

SANTOS, N. C.; DIAS, C. N.; COUTINHO-MORAES, D. F.; VILANOVA, C. M.; GONÇALVES, J. R. S.; SOUZA, N. S. ROSA, I. G. Toxicidade e avaliação de atividade moluscicida de folhas de *Turnera ulmifolia* L. **Revista Brasileira de Biociências**, v.8, n. 4, p. 324-329, 2010.

SANTOS, R. L. **Desenvolvimento de um dentifrício a partir de extrato nebulizador de *Schinopsis brasiliensis* Engler**. 2013. 144p. Dissertação (Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas) – Universidade Estadual da Paraíba, Centro de Ciências Biológicas e da Saúde. 2013.

SARAIVA, A. A.; CASTRO, R. H. A.; CORDEIRO, R. P.; SOBRINHO, T. J. S. P.; CASTRO, V. T. N. A.; AMORIM, E. L. C.; XAVIER, H. S.; PISCIOTTANO, M. N. C. *In vitro* evaluation of antioxidante, antimicrobial and toxicity properties of extracts of *Schinopsis brasiliensis* Engl. (anacardiaceae). **African Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v.5, n.14, p. 1724-1731, 2011.

SCAPIN, M. A. **Aplicação da difração e fluorescência de raios-x (WDXRF): Ensaio em argilominerais**. Dissertação de Mestrado, Universidade de São Paulo, p. 80, 2003.

SEVERI, J. A. **Uso Sustentável da Biodiversidade Brasileira Prospecção Químico- farmacológica de Plantas Superiores: *Guapira noxia* (Nyctaginacear)**. Araraquara-SP: 2007. 117f. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) – Universidade Estadual Paulista, 2007.

- SILVA JÚNIOR, J. O. C.; VIEIRA, J. L. F.; BARBOSA, W. L. R.; PEREIRA, N. L. Caracterização físico-química do extrato fluído e seco por nebulização de *Symphytum officinale* L. **Revista brasileira de Farmacognosia**, v. 16 (Suplemento), p. 671-677, 2006.
- SILVA, E. C.; PAOLA, M. V. R. V.; MATOS, J. R. Análise térmica aplicada à cosmetologia. **Revista Brasileira de ciências farmacêuticas**, v.43, n. 3, p. 347-356, 2007.
- SILVA, L.A.; SCARIOT, A. Composição e estrutura da comunidade arbórea de uma floresta estacional decidual sobre afloramento calcário no Brasil Central. **R. Árvore**, Viçosa – MG, v. 28, n. 1, p. 69-75, 2004.
- SILVA, M. S. P. S. et al. Study bioprospecting of medicinal plant extracts of the semiarid northeast: contribution to the controlo f oral microorganisms. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, v. 2012, 2012a.
- SILVA, M. S. P.; BRANDRÃO, D. O.; CHAVES, T. P. FORMIGA FILHO, A. L. N.; COSTA, E. M. B.; SANTOS, V. L.; MEDEIROS, A. C. D. Study bioprospecting of medicinal plant extracts of the semiarid northeast: contribution to the controlo f oral microorganisms. **Evidence-Based Complementary and alternative Medicine**, v. 2012.
- SILVA, V. A.; FREITAS, A. F. R.; PEREIRA, M. S. V.; SIQUEIRA JÚNIOR, J. P.; PEREIRA, A. V.; HIGINO, J. S. Avaliação *in vitro* da atividade antimicrobiana do extrato da *Lippia sidoides* Cham. Sobre isolados biológicos de *Staphylococcus aureus*. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 12, n. 4, p. 452-455, 2010.
- SILVEIRA, E. P.; COSTA, R. B.; FELFILI, J. M. Florística da vegetação remanescente de Cerrado sensu stricto em terra indígena no noroeste de Mato Grosso, Brasil. **Rev. Biol. Neotrop.**, v.6, n. 2, p. 15-25, 2009.
- SOARES, D. G. S.; OLIVEIRA, C. B.; LEAL, C. DRUMOND, M. R. S.; PADILHA, W. W. N. Atividade antibacteriana *in vitro* da Tintura de Aroeira (*Schinus terebinthifolius*) na Descontaminação de Escovas Dentais Contaminadas pelo *S. mutans*. **Pesquisa Brasileira em Odontopediatria e Clínica Integrada**, v. 7, n. 3, p. 253-257, 2007.
- SOUZA, C. M. P. ***Opuntia ficus-indica* (L) Mill.**: Caracterização físico-química e avaliação do efeito antioxidante, antibacteriano, fotoprotetor e inibidor da tirosinase. 2012.105p. Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Pernambuco. CCS. Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, 2012.
- SUMMERS, W. C. Microbial Drug Resistance: A Histórical Perspective. In: WAX, R. G.; LEWIS, K.; SALYERS, A. A.; TABER, H. **Bacterial resistance to antimicrobials**. 2. ed. Boca Raton, FL: CRC Press, 2008.
- TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Fisiologia Vegetal**. 3.ed. Porto Alegre: Artmed, 2004.

TAVARES, W. Bactérias gram-positivas problemas: resistência do estafilococo, do enterococo e do pneumococo aos antimicrobianos. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 33, n. 3, p. 281-301, 2000.

TITA, B.; FULIAS, A.; BANDUR, G.; MARIAN, E. TITA, D. Compatibility study between ketoprofen and pharmaceutical excipients used in solid dosage forms. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 56, p. 221-227, 2011.

TORRES, C. R. G.; KUBO, C. H.; ANIDO, A. A.; RODRIGUES, J. R. Agents antimicrobianos e seu potencial de uso na odontologia. **RPG – Revista da Pós-Graduação da FOUSP**, São José dos Campos, v. 3, n. 2, p. 43-52, jul./dez., 2000.

TROVÃO, D. M. B. M.; SILVA, S. C.; SILVA, A. B.; JÚNIOR, R. L. V. Estudo comparativo entre três fisionomias de caatinga no Estado da Paraíba e análise do uso das espécies vegetais pelo homem nas áreas do estudo. **Revista de Biologia e Ciências da Terra**, v. 4, n. 2, 2004.

VAHABI, S. et al. The effect of antimicrobial photodynamic therapy with radachlorin and toluidine blue on *Streptococcus mutans*: an in vitro study. **J Dent (Tehran)**, v. 8, p. 48-54, 2011.

VIOLANTE, I. M. P. et al. Antimicrobial activity of some medicinal plants from the cerrado of the central-western region of Brazil. **Braz J Microbiol**, v. 2012, p. 1302-1308, Jun 2012.

WILLIAMSON, J. D.; JENNINGS, D. B.; GUO, W.; PHARR, D. M. Sugar alcohols, salt stress and fungal resistance: polyols – multifunctional plant protection? **J. Am. Soc. Hortic. Sci.**, 127 (4) 467-473, 2002.

ZANIN, S. M. W.; MIGUEL, M. D.; BARREIRA, S. M. W.; NAKASHIMA, T.; CURY, C. D.; COSTA, C. K. **Enxaguatório bucal: principais ativos e desenvolvimento de fórmula contendo extrato hidroalcoólico de *Salvia officinalis* L.** 2007.