



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

**POTENCIAL DE EXTRATOS DA *Schinopsis brasiliensis* ENGL. PARA
DESENVOLVIMENTO DE PRODUTOS ODONTOLÓGICOS**

Pedro Henrique Sette de Souza

Campina Grande/PB

2015

PEDRO HENRIQUE SETTE DE SOUZA

**POTENCIAL DE EXTRATOS DA *Schinopsis brasiliensis* ENGL. PARA
DESENVOLVIMENTO DE PRODUTOS ODONTOLÓGICOS**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Odontologia da Universidade Estadual da Paraíba como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Odontologia.

Orientadora: Prof^ª Dr^ª Ana Cláudia Dantas de Medeiros

Co-orientadora: Prof^ª Dr^ª Francinalva Dantas de Medeiros

Campina Grande/PB

2015

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

S719p Souza, Pedro Henrique Sette de.
Potencial de extratos da *Schinopsis brasiliensis* Engl. para desenvolvimento de produtos odontológicos [manuscrito] / Pedro Henrique Sette de Souza. - 2015.
132 p. : il. color.

Digitado.
Dissertação (Mestrado em Odontologia) - Universidade Estadual da Paraíba, Pró-Reitoria de Pós-Graduação e Pesquisa, 2015.
"Orientação: Profa. Dra. Ana Cláudia Dantas de Medeiros, Pró-Reitoria de Pós-Graduação e Pesquisa".
"Co-Orientação: Profa. Dra. Francinalva Dantas de Medeiros, Departamento de Farmácia".
1. Plantas medicinais. 2. *Schinopsis brasiliensis* Engl. 3. Atividade antimicrobiana. I. Título.

21. ed. CDD 615.321

PEDRO HENRIQUE SETTE DE SOUZA

**POTENCIAL DE EXTRATOS DA *Schinopsis brasiliensis* ENGL. PARA
DESENVOLVIMENTO DE PRODUTOS ODONTOLÓGICOS**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Odontologia da Universidade Estadual da Paraíba como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Odontologia.

DATA DA DEFESA: 25/05/2015

BANCA EXAMINADORA


Prof Dr Ricardo Dias de Castro

Examinador Externo (UFPB)


Prof Dr Manuel António Gordon-Núñez

Examinador Interno (UEPB)


Profª Drª Ana Cláudia Dantas de Medeiros

Orientadora e Presidenta da Banca (UEPB)

Dedico esse trabalho à minha família, em especial meus pais e minha irmã, que nunca mediram esforços para me ajudar a realizar meus sonhos. Por todo amor, companheirismo e dedicação...

AGRADECIMENTOS

À minha família, especialmente a minha vovó Têê, a qual mesmo com enormes saudades e com a frágil saúde, sempre foi uma das maiores incentivadoras do meu crescimento acadêmico e sempre me recebia de braços abertos com um “Seja bem vindo” todas as vezes que regressei a Natal.

Aos meus pais e minha irmã Natália, por desde sempre ser meu suporte, procurando ajudar de todas as formas possíveis e quase não possíveis; por todo amor e carinho. Por, de fato, acreditarem em mim.

Às “Dantas de Medeiros”, minhas orientadoras, Ana Cláudia e Francinalva, que foram de extrema atenção e dedicação durante essa passagem no mestrado. Agradeço pela compreensão, pela atenção e, acima de tudo, por acreditarem na minha capacidade de fazer um trabalho bem feito, sem mesmo me conhecer.

À equipe/família do LABDEM, Jocimar, Cleildo, Joffily, Lianne, Alinne, Renê, Fernanda, Airlla e Paulo, que sempre estiveram ali presente, lado-a-lado com as conquistas e com todo e qualquer resultado. Pelos momentos de tensão e descontração. Sem vocês, sem dúvidas, o trabalho teria sido muito mais difícil.

Às minhas companheiras de docência Vanda Sanderana, Danielle Nascimento e Aluana Brandão, por todas as conversas, aconselhamentos, risadas e momentos de desabafo.

À família Vilar que me acolheu como um filho em Campina Grande, sempre me apoiando e me dando meios de conseguir aquilo que eu desejava.

À professora Mary Ann Foglio pela atenção e palavras de apoio durante o período sanduíche que passei no Centro Pluridisciplinar de Pesquisas Químicas, Biológicas e Agrônomas, da Universidade Estadual de Campinas (CPQBA – Unicamp). Bem como a professora Marta Cristina Teixeira Duarte que me recebeu de braços abertos na divisão de Microbiologia. Todas as contribuições foram primordiais para o engrandecimento e conclusão desse trabalho.

Ao pessoal do CPQBA-Unicamp, Ilza, Núbia, Lari, Lais, Verônica, Carol, Leila Servat, Leila Giarola , Vanessa, Marina, Humberto, Naty e Camila, que alegravam minhas manhãs, faziam com que eu me sentisse parte deles e, sem dúvidas alguma, amenizaram a distância e as saudades de casa.

Ao ex-companheiro de karate, hoje professor da Unicamp, Ewerton Lima, por ter me recebido tão bem em sua residência no período que passei em Campinas.

Aos alunos e professores do curso de Graduação em Odontologia, do Campus VIII da UEPB por toda energia positiva, torcida e engrandecimento profissional que vocês me propiciaram.

Aos colegas da turma do mestrado, Arlley, Érika, Portela, Guga, Júlio, Lorena, Martina, Onilson, Ramon e Rayanne, que sempre estiveram presentes, em algum momento, dessa caminhada, seja em sala de aula, seja nas conversas paralelas, nos desabafos, nas cobranças...

Aos meus amigos de Natal/RN, Douglas, Gabriel, Ian, Isa, Cintia, Elo, Huguinho e Raquel, além da minha querida professora e amiga Maria Regina por toda a torcida e apoio que vocês me deram ao longo desses quase dois anos.

Ao Programa de Pós-Graduação da Universidade Estadual da Paraíba (PPGO-UEPB), ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pelos auxílios financeiros para a realização dessa pesquisa.

Agradeço a todos que contribuíram de alguma forma com essa conquista e que compreenderam amavelmente meus momentos de ausência.

*Ó garrafada das ervas maceradas do breu das brenhas
se adonai de mim e do meu peito lacerado
ó senhora dos remédios*

<i>Ó doce dona</i>	<i>respingai grossas</i>
<i>ó chá</i>	<i>gotas de vossos venenos</i>
<i>ó unguento</i>	<i>ó doce dona</i>
<i>ó destilado</i>	<i>ó camomila</i>
<i>ó camomila</i>	<i>ó belladona</i>
<i>ó belladona</i>	
<i>ó phármakon</i>	

*serenai minhas irremediáveis pupilas dilatadas
ó senhora dos sem remédios
domai as minhas brutas ânsias acrobáticas
que suspensas piruetam pânicas nas janelas do caos*

*se desprendem dos trapézios
e, tontas, buscam o abraço fraterno e solidário dos espaços vácuos
ó garrafada das maceradas ervas do breu das brenhas
adonai-vos do peito lacerado e do lenho oco que ocupo*

Feitiço de Oração (Wally Salomão)

*"Mestre, depois de pai, é o nome mais nobre
e doce que um homem pode dar a outro"*

Edmondo de Amicis

Potencial de extratos da *Schinopsis brasiliensis* Engl. para desenvolvimento de produtos odontológicos

RESUMO

INTRODUÇÃO: A busca de alternativas viáveis para o tratamento das infecções bucais é de suma importância, uma vez que a resistência aos antibióticos se tornou um grande problema para a ciência médica. **OBJETIVO:** Avaliar o potencial de extratos da casca da *S. brasiliensis* Engl. para desenvolvimento de produtos odontológicos. **MÉTODOS:** Os extratos etanólico e hidroalcoólico foram produzidos por maceração e ultrassom. A partição líquido-líquido foi realizada com hexano, clorofórmio e acetato de etila. A triagem fitoquímica foi feita através da solução de amostras com reagentes padrões para quantificação de metabólitos secundários. A identificação e quantificação do marcador químico foi realizado através da Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (HPLC). As micropartículas foram produzidas em um aparelho de *spray dryer*. A eficiência de encapsulação foi aferida através da diferença de leitura em espectrofotômetro do teor do extrato encapsulado e do teor encontrado na superfície das micropartículas. A degradação térmica foi observada por termogravimetria (TG) e análise térmica diferencial (DTA), em uma atmosfera de nitrogênio. Já o potencial citotóxico foi analisado com base no potencial hemolisante e do índice de seletividade (IS) das amostras. Além disso, a ação antibacteriana foi avaliada com base na concentração inibitória mínima (CIM) frente a cepas padrões ATCC de *Streptococcus mutans*, *Streptococcus mitis*, *Streptococcus oralis*, *Streptococcus salivarius*, *Staphylococcus aureus* e *Enterococcus faecalis*, bem como um isolado clínico de *E. faecalis* e do ensaio por bioautografia. A amostra com melhor resultado nesses ensaios foi submetida a caracterização por Cromatografia Gasosa/Espectrometria de Massa (GC/MS) bem como ao processo de separação por Cromatografia em Coluna. **RESULTADOS:** O ácido gálico foi identificado como composto majoritário nas amostras analisadas. Todas as amostras foram capazes de inibir o crescimento dos microrganismos testados, com exceção do isolado clínico de *E. faecalis*, em uma concentração $\leq 1,0$ mg/mL e não apresentaram citotoxicidade com IS superior a 22. O extrato etanólico absorve menos calor do que as suas frações. Todas as amostras apresentam pico exotérmico compatível com a degradação do ácido gálico. A fração que apresentou melhor atividade antimicrobiana foi a fração hexano (CIM = 0,125 mg/mL), posteriormente utilizada para realização da Cromatografia em Coluna e bioautografia, resultando em 12 novas subfrações. A fração G apresentou CIM inferior à da fração hexano frente aos *E. faecalis*, 0,063 mg/mL. A GC/MS revelou a presença β -Sitosterol na fração hexano. A micropartícula produzida com vazão de 0,4 mL/min apresentou a maior eficiência de encapsulação (88%) e melhor CIM (0,250 mg/mL e 0,500 mg/mL) frente aos *E. faecalis*, mesmo apresentando a menor concentração de fitocompostos. Apenas o extrato hidroalcoólico utilizado para confecção das micropartículas apresentou flavonoides (10,16 mg). A micropartícula 4 absorve mais calor do que todas as outras amostras, se degradando mais que as demais. **CONCLUSÃO:** Todas as amostras testadas provenientes de *S. brasiliensis* Engl. apresentam potencial para serem utilizados como base para o desenvolvimento de produtos odontológicos para combater as infecções bucais.

Palavras Chave: Plantas Medicinais. *Schinopsis brasiliensis* Engl. Atividade Antimicrobiana. Composto Químico Majoritário. Cromatografia Líquida de Alta Eficiência.

Potential of extracts from *Schinopsis brasiliensis* Engl. to development of dental products

ABSTRACT

BACKGROUND: The search for viable alternatives for the treatment of oral infections is important since resistance to antibiotics has become a big problem in medical science. **OBJECTIVE:** To evaluate the potential of extracts from bark's *Schinopsis brasiliensis* Engl. to development of dental products. **METHODS:** The ethanol and hydroalcoholic extracts were produced by maceration and ultrasound. The liquid-liquid partition was performed with hexane, chloroform and ethyl acetate. The phytochemical screening was performed using the sample solution with standard reagents for quantification of secondary metabolites. The identification and quantification of chemical marker was performed by High Performance Liquid Chromatography (HPLC). Microparticles were produced in by spray dryer. The encapsulation efficiency was measured by absorbance difference of encapsulated extract content and the content found on the surface of the microparticles. Thermal degradation was observed by thermogravimetry (TG) and differential thermal analysis (DTA) in a nitrogen atmosphere. The cytotoxic potential was analyzed based on the potential Hemolyzing and the selectivity index (SI) of the samples. In addition, the antibacterial activity was evaluated based on minimum inhibitory concentration (MIC) against ATCC standard strains of *Streptococcus mutans*, *Streptococcus mitis*, *Streptococcus oralis*, *Streptococcus salivarius*, *Staphylococcus aureus* and *Enterococcus faecalis*, as well as a clinical isolate of *E. faecalis* and testing by bioautography. The sample with better outcome in these tests was subjected to characterization by Gas Chromatography / Mass Spectrometry (G/MS) as well as the process of separation by column chromatography. **RESULTS:** Gallic acid was identified as a major compound in the samples analyzed. All samples were able to inhibit the growth of the microorganisms, with the exception of *E. faecalis* clinical isolate, in a concentration of ≤ 1.0 mg/mL and showed no cytotoxicity up to 22 SI. The ethanol extract absorbs less heat than their fractions. All samples exhibit exothermic peak compatible with the degradation of gallic acid. The fraction that showed the best antimicrobial activity was the hexane fraction (MIC = 0.125 mg / mL), subsequently used to perform the chromatography column and bioautography, resulting in 12 new subfractions. The fraction G showed a MIC lower than hexane fraction against *E. faecalis*, 0.063 mg/mL. GC/MS revealed the presence of β -sitosterol in the hexane fraction. The microparticle produced with a flow rate of 0.4 mL/min showed the highest encapsulation efficiency (88%) and better MIC (0.250 mg/mL and 0.500 mg/mL) to both *E. faecalis*, even with the lowest concentration of phytocompounds. Only the hydroalcoholic extract used for making the microparticles showed flavonoids (10.16 mg). The microparticle 4 absorbs more heat than all other samples, degrading more than the others. **CONCLUSION:** All tested samples from *S. brasiliensis* Engl. showed potential to be used as a basis for the development of dental products for combating oral infections.

Keywords: Medical Plants. *Schinopsis brasiliensis* Engl. Antimicrobial activity. Majority Chemical Compound. High Performance Liquid Chromatography.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1	Identificação dos locais de ocorrência natural de <i>Schinopsis brasiliensis</i> Engl no Brasil.....	24
Quadro 1	Sistemas de solvente utilizados para realização da Cromatografia em Coluna.....	32
Artigo 1	Determinação do composto majoritário, citotoxicidade, atividade antibiofilme e perfil de degradação térmica de frações do extrato de <i>Schinopsis brasiliensis</i> Engl.	
Figura 1	Cromatograma das amostras.....	51
Figura 2	Curva de TG do ácido gálico e das amostras produzidas a partir do extrato de <i>S. brasiliensis</i> Engl.....	52
Figura 3	Curva de DTA do ácido gálico e das amostras produzidas a partir do extrato de <i>S. brasiliensis</i> Engl.....	53
Artigo 2	Desenvolvimento, caracterização e atividade antibiofilme de micropartículas produzidas a partir de extrato de <i>Schinopsis brasiliensis</i> Engl.	
Figura 1	Curva de TG do extrato hidroalcólico e das micropartículas produzidas a partir do extrato da <i>S. brasiliensis</i> Engl.....	78
Figura 2	Curva de DTA do extrato hidroalcólico e das micropartículas produzidas a partir do extrato da <i>S. brasiliensis</i> Engl.....	79
Artigo 3	Caracterização e fracionamento de extrato da <i>Schinopsis brasiliensis</i> Engl. bioguiado pela atividade antimicrobiana frente à <i>Enterococcus faecalis</i>	
Figura 1	GC da fração hexano do extrato etanólico da casca da <i>S. brasiliensis</i>	92

LISTA DE TABELAS

Artigo 1	Determinação do composto majoritário, citotoxicidade, atividade antibiofilme e perfil de degradação térmica de frações do extrato de <i>Schinopsis brasiliensis</i> Engl.	
Tabela 1	Potencial Hemolisante, IC ₅₀ , Concentração Inibitória Mínima (CIM – mg/mL) e Índice de Seletividade (IS) das soluções testadas.....	54
Tabela 2	Quantidade de taninos totais, flavonoides totais e polifenóis totais dos extratos de <i>S. brasiliensis</i> Engl. obtidos por espectroscopia na região visível.....	55
Tabela 3	Dados da curva de TG do extrato e frações de <i>S. brasiliensis</i> Engl.....	56
Artigo 2	Desenvolvimento, caracterização e atividade antibiofilme de micropartículas produzidas a partir de extrato de <i>Schinopsis brasiliensis</i> Engl.	
Tabela 1	Eficiência de Encapsulação (EE), quartil 25, mediana e quartil 75 das amostras, conforme vazão utilizada.	74
Tabela 2	Dados da curva de TG do extrato hidroalcolico e das micropartículas de <i>S. brasiliensis</i> Engl.....	75
Tabela 3	Potencial hemolisante, Concentração Inibitória Mínima (CIM – mg/mL) e Índice de Seletividade das soluções testadas.....	76
Tabela 4	Quantificação de taninos, flavonoides e polifenóis totais expressos de acordo com o correspondente de cada padrão, em mg/g.....	77
Artigo 3	Caracterização e fracionamento de extrato da <i>Schinopsis brasiliensis</i> Engl. bioguiado pela atividade antimicrobiana frente a <i>Enterococcus faecalis</i>	
Tabela 1	Concentração Inibitória Mínima, em mg/mL, das soluções testadas frente às bactérias testadas.....	90
Tabela 2	Estrutura química, tempo de retenção e percentual de confiabilidade da identificação dos compostos da fração hexano da <i>S. brasiliensis</i> , identificados no GC.....	91

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

PB – Paraíba

LABDEM – Laboratório de Desenvolvimento e Ensaio de Medicamentos

CPQBA – Centro Pluridisciplinar de Pesquisas Químicas, Biológicas e Agrícolas

Unicamp – Universidade Estadual de Campinas

UEPB – Universidade Estadual da Paraíba

RN – Rio Grande do Norte

PPGO – Programa de Pós-Graduação em Odontologia

CNPq – Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico

CAPES – Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior

OMS – Organização Mundial da Saúde

CIM – Concentração Inibitória Mínima

IS – Índice de Seletividade

TG – Termogravimetria

DTA – Análise Térmica Diferencial

GC – Cromatografia Gasosa

IC₅₀ - Concentração das Amostras capaz de causar hemólise em 50 % das hemácias

EfE – Eficiência de Encapsulação

EE – Extrato Etanólico

E. faecalis – *Enterococcus faecalis*

S. mu ou *S. mutans* – *Streptococcus mutans*

S. o ou *S. oralis* – *Streptococcus oralis*

S. mi ou *S. mitis* – *Streptococcus mitis*

S. s ou *S. salivarius* – *Streptococcus salivarius*

S. a ou *S. aureus* – *Staphylococcus aureus*

MRSA – *Staphylococcus aureus* resistente à metilina

PRU – Herbário Professor Jayme Coelho de Morais

RPM – Rotação por Minuto

°C – Graus Celsius

L – litro

mL – mililitro

μL – microlitro

g – grama

mg – miligrama

μg – micrograma

m – massa

v – volume

p – peso

EE – Extrato Etanólico

EH – Extrato Hidroalcoólico

Hex – Fração Hexano

Clo – Fração Clorofórmio

AcEt – Fração Acetato de Etila

nm – nanometro

CLAE – Cromatografia Líquida de Alta Eficiência

h – hora

S – Quantidade de extrato encontrado na superfície da micropartícula

T – Quantidade de extrato total da micropartícula

ATCC – *American Type Culture Collection*

FIOCRUZ – Fundação Oswaldo Cruz

CLSI – *Clinical Laboratory Standards Institute*

UFC – Unidades Formadoras de Colônia

DMSO – Dimetilsulfóxido

BHI – *Brain Heart Infusion*

CCD – Cromatografia em Camada Delgada

Ph – Potencial Hemolisante

Ae – Absorbância da amostra testada

Ab – Branco da amostra testada

At - Absorbância do Controle Positivo

$\mu 3$ – micropartícula 3

$\mu 4$ – micropartícula 4

$\mu 5$ – micropartícula 5

CHX - Clorexidina

SUMÁRIO

1 CONSIDERAÇÕES INICIAIS	20
2 OBJETIVOS	25
2.1 OBJETIVO GERAL	25
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	25
3 METODOLOGIA	26
3.1 PREPARAÇÃO DOS EXTRATOS DE <i>Schinopsis brasiliensis</i> ENGL.....	26
3.1.1 Obtenção e Identificação do Material Vegetal.....	26
3.1.2 Preparo dos extratos.....	26
3.1.3 Partição líquido-líquido do extrato etanólico.....	26
3.2 CARACTERIZAÇÃO QUÍMICA DOS EXTRATOS.....	27
3.2.1 Triagem fitoquímica	27
3.2.1.1.Determinação do Teor de Polifenóis Totais.....	27
3.2.1.2 Determinação do Teor de Flavonoides.....	27
3.2.1.3 Determinação do Teor de Taninos Condensados.....	28
3.2.2 Determinação e Quantificação do composto majoritário.....	28
3.2.3 Cromatografia Gasosa/Espectrometria de Massa.....	28
3.3 PRODUÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DAS MICROPARTÍCULAS.....	29
3.3.1 Produção das Micropartículas.....	29
3.3.2 Eficiência de Encapsulação.....	29
3.4.ANÁLISE MICROBIOLÓGICA DOS EXTRATO DE <i>Schinopsis brasiliensis</i> ENGL.....	30
3.4.1 Linhagens Bacteriana.....	30
3.4.2 Determinação da Concentração Inibitória Mínima dos extratos de <i>S.brasiliensis</i> Engl.....	30
3.4.3 Estudo bioguiado pela atividade antimicrobiana frente a <i>Enterococcus faecalis</i>	31
3.4.4 Separação de compostos da fração hexânica.....	31
3.5 CITOTOXICIDADE EM ERITRÓCITOS E ÍNDICE DE SELETIVIDADE.	32
3.6 ANÁLISE TÉRMICA.....	32
3.6.1 Termogravimetria e Análise Térmica Diferencial.....	33

4 RESULTADOS	34
4.1 Artigo 1.....	35
4.2 Artigo 2.....	57
4.3 Artigo 3.....	80
5 CONSIDERAÇÕES FINAIS	93
6 REFERÊNCIAS	94
ANEXOS	

1. CONSIDERAÇÕES INICIAIS

1.1. DOENÇAS BUCAIS BIOFILME-DEPENDENTE

O biofilme dentário é um nicho de microrganismos diferentes em uma matriz extracelular com glucanos solúveis e insolúveis, altamente dinâmico e bem estruturado aderido à superfície dentária. Esse biofilme residente do indivíduo o protege da infecção por outros microrganismos, desde que haja um equilíbrio com o ambiente bucal. Entretanto, quando há um desequilíbrio nesse nicho, tem-se a instalação de infecções, como é o caso da cárie dentária e da doença periodontal (SALLJ; OUWEHAND, 2015, KLEIN et al, 2015).

Essas infecções, por serem as mais comuns nos seres humanos (KISTLER; PESARO; WADE, 2015, SALLJ; OUWEHAND, 2015), são umas das mais dispendiosas em todo mundo (MARCENES et al, 2013; KISTLER; PESARO; WADE, 2015). Portanto, a prevenção dessas doenças é fator primordial para a saúde pública, e deve ser feita, além da remoção mecânica do biofilme, com colutório e dentifrícios que contenham agentes ativos para controlar os microrganismos presentes no biofilme dentário, que sejam seletivos para os microrganismos (KISTLER; PESARO; WADE, 2015).

1.2. *Enterococcus faecalis* E SEU PAPEL EM INFECÇÕES

O *Enterococcus faecalis* é uma bactéria gram-positiva que faz parte da microbiota do trato gastrointestinal e urinário (SAVA et al, 2010, WILLEMS et al, 2011, LINS et al, 2013). O *E. faecalis* é responsável por mais de 90% dos casos de infecções causadas por bactérias do gênero *Enterococcus* (FISHER; PHILLIPS, 2009), incluindo endocardite bacteriana, infecções no trato urinário e bacteremia causadoras de meningite (SENEVIRATNE et al, 2013), além de infecções endodônticas (MOHAMED; HUANG, 2007, SIQUEIRA; RÔÇAS, 2009, ZHU et al, 2010), podendo estar associada à cárie e a doença periodontal (ZHU et al, 2010).

A forte resistência a antimicrobianos foi relatada por Lins et al. (2013) que encontraram uma prevalência de 70% de *E. faecalis* resistentes à tetraciclina, corroborando os achados da crescente resistência de isolados orais da bactéria frente a tal antibiótico durante os anos 2000 e 2010 (PINHEIRO et al, 2004, SEDGLEY et al, 2005, REYNAULD AF GEIJERSSTAM et al, 2006, SKUCAITE et al, 2010, LINS et

al, 2013). Esses achados reforçam a necessidade de se buscar alternativas terapêuticas para infecções endodônticas, tendo em vista as evidências existentes da associação do *E. faecalis* nas infecções endodônticas, sejam elas primárias ou secundárias (SASSONE et al, 2007)

1.3. POR QUE PESQUISAR PRODUTOS NATURAIS?

As bactérias são os microrganismos mais comuns e numerosos encontrados na cavidade bucal (ZAURA et al, 2009). A resistência de microrganismos aos antibióticos se tornou um grande problema para a ciência médica, que busca novas terapêuticas para desenvolver produtos mais sensíveis aos microrganismos (PEREIRA et al, 2011). Por isso, a pesquisa com produtos naturais vem crescendo gradativamente. Na odontologia, essas pesquisas visam o efeito sobre bactérias e fungos, principalmente frente aos agravos bucais mais prevalentes, como cárie e doença periodontal (SPONCHIADO et al, 2014, SANTAMARIA JUNIOR et al, 2014, LIMA et al, 2014).

Para Castro et al (2009), os produtos naturais apresentam compostos biológicos diluídos na amostra, enquanto a clorexidina é uma droga sintética, por isso tendem a necessitar de maior concentração para poder combater os microrganismos. Porém, é importante destacar que a clorexidina possui efeitos adversos que restringem o período de utilização. Em uma recente revisão sistemática, Haas et al (2014) mostraram que a clorexidina apresentou bons resultados na redução do biofilme e da gengivite, entretanto, devem ser indicados para tratamentos curtos, pelos seus efeitos adversos, sendo os agentes a base de produtos naturais mais indicados para o uso diário.

1.4. TRATAMENTO ATUAL DAS INFECÇÕES ENDODÔNTICAS

Um dos objetivos do tratamento endodôntico, além da retirada do foco de infecção, é a manutenção do dente em função. (ESPÍNDOLA et al, 2002). Logo, uma das maneiras de garantir o sucesso do tratamento endodôntico é limpando e tratando adequadamente os canais radiculares (PERUCHI et al, 2013). O tratamento intracanal com a pasta de Hidróxido de Cálcio, apesar de acarretar inúmeros benefícios ao paciente e de seu efeito bactericida, não consegue eliminar totalmente os *E. faecalis* presente nos condutos (EVANS et al, 2002).

Sundqvist et al (1998), em seu estudo, concluíram que cerca de 40% dos casos de insucesso da terapia endodôntica, estava associada a predominância de *Enterococcus faecalis*. Contudo, os autores acreditam que a seleção dos microrganismos acontece de acordo com a resistência específica deles aos medicamentos antimicrobianos utilizados durante o tratamento. Já Evans et al (2002), afirmam que microrganismos resistentes aos efeitos alcalinos do Hidróxido de Cálcio, como os *Enterococcus faecalis*, são capazes de manter o pH intracitoplasmático em níveis compatíveis com sua sobrevivência, independente das alterações do meio ambiente.

Segundo Chou et al (2008) o aparecimento de cepas multirresistentes na última década é o maior problema para o tratamento de infecções causadas pelo *E. faecalis*. É importante salientar que a eficiência do medicamento utilizado no tratamento endodôntico dependerá da vulnerabilidade dos microrganismos ali envolvidos (GOMES et al, 2003). Por isso, quando há eliminação dos microrganismos mais sensíveis, pode haver favorecimento ao crescimento dos mais resistentes, como é o caso do *Enterococcus faecalis*, ocasionando o insucesso do tratamento.

Uma alternativa para o tratamento utilizando hidróxido de cálcio é o gel de clorexidina a 2%, pois este apresenta uma ação antibacteriana superior contra *Enterococcus faecalis*. Contudo, diversos estudos apontam inúmeros efeitos adversos pelo uso da terapia com a clorexidina (JONES, 1996, GOMES et al, 2003, MARSH, 2005, ERCAN; DALLI; DÜLGERGIL, 2006, ZANATTA; RÖSING, 2007, MARSH, 2010).

1.5. FITOTERAPIA: UMA ALTERNATIVA VIÁVEL NO COMBATE A INFECÇÕES

Ao longo dos anos, a medicina moderna vem se tornando mais receptiva à medicina natural. Desde a Declaração de Alma-Ata (1978), a Organização Mundial de Saúde tem se mostrado a favor da valorização de se utilizar as plantas medicinais na saúde (BRASIL, 2006). No Brasil, o Ministério da Saúde apresentou em 2006 a Política Nacional de Práticas Integrativas e Complementares no Sistema Único de Saúde. Tal política atende à necessidade de se conhecer, apoiar, incorporar e implementar experiências que já vem sendo desenvolvidas na rede pública de diversos municípios, dentre as quais, a fitoterapia. Essa prática complementar está presente em 22 unidades

da Federação (BRASIL, 2006). Assim, o uso de antimicrobianos derivados de plantas vem sendo cada vez mais estudados, tendo em vista a resistência a alguns antimicrobianos sintéticos convencionais apresentada pelos microrganismos (ALLAKER; DOUGLAS, 2009). Nesse contexto, estudos laboratoriais recentes de Macedo-Costa et al, (2014) e Sette-de-Souza et al, (2014) já demonstraram o efeito de extratos de plantas endêmicas no Brasil frente a microrganismos bucais.

1.5.1. *Schinopsis brasiliensis* Engl.

A *Schinopsis brasiliensis* Engl. é árvore da família Anacardiaceae, de comportamento decíduo, podendo atingir até 15m de altura. Sua casca externa é cinzenta, quase negra, áspera e desprende-se em porções irregularmente quadrangulares, com espessura de até 30 mm. É encontrada desde a latitude 5° S no Ceará e Rio Grande do Norte, até 20° S em Mato Grosso e Minas Gerais (Figura 1). É popularmente conhecida como braúna, quebracho ou chamacoco. Na caatinga, possui caráter solitário, sendo encontrados no máximo 15 indivíduos por hectare (CARVALHO, 2008).

Saraiva et al (2013) descreveram o potencial antimicrobiano da *Schinopsis brasiliensis* Engl frente à *Staphylococcus aureus* MRSA multirresistentes. Em outro estudo, Saraiva et al (2011) avaliaram a atividade antioxidante, antimicrobiana e possível toxicidade do extrato metanólico da *S. brasiliensis*. Já Donati et al (2014) notaram a atividade do óleo essencial da planta frente a *Staphylococcus aureus* e *Candida parapsilosis*. Ainda é importante salientar a grande atividade frente à *Enterococcus faecalis*, *Pseudomonas aeruginosa* e *S. aureus* de extrato hidroalcolico da *Schinopsis brasiliensis* relatados por Silva et al (2012). Popularmente, suas partes são utilizadas na medicina para diversos agravos (ALMEIDA et al, 2005, ALBUQUERQUE, 2006, ALBUQUERQUE et al, 2007). A *S. brasiliensis* também é utilizada pelos índios kariri-xocó e xocó, sendo sua casca triturada e cozida é usada para aliviar dores de dente, e o chá da casca é usado no combate à dor de ouvido (CARVALHO, 2008).

Tais atividades podem estar relacionadas com a presença de alguns fitoconstituintes na planta. Cardoso et al (2004) elucidaram a estrutura de um novo fenol alquil, isolado na fração hexânica do extrato metanólico da casca da *S. brasiliensis*, além de evidenciar a presença de derivados esteroides de ergosterol. A

caracterização fitoquímica do óleo essencial das folhas desta planta mostrou uma forte presença de mirceno, um monoterpene com atividade antioxidante (DONATI et al, 2014). Já Santos et al (2014) detectaram a presença de flavonoides e taninos no extrato hidroalcolico da casca da *S.brasiliensis*, bem como a ausência de toxicidade. Ainda é possível detectar, qualitativamente, a presença de auronas, catequinas, chalconas, flavononas, saponinas e taninos na fração acetato de etila do extrato hidroalcolico, enquanto que na fração hexânica e na clorofórmica apenas esteroides e triterpenos, respectivamente.



Figura 1: Identificação dos locais de ocorrência natural de *Schinopsis brasiliensis* Engl no Brasil. (CARVALHO, 2008)

2. OBJETIVO

2.1. OBJETIVO GERAL

Avaliar o potencial de extratos da casca da *Schinopsis brasiliensis* Engl. para desenvolvimento de produtos odontológicos.

2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Quantificar os compostos fitoquímicos presentes nos extratos;
- Identificar e quantificar o composto majoritário dos extratos;
- Avaliar a citotoxicidade dos extratos obtidos em eritrócitos;
- Determinar a Concentração Inibitória Mínima (CIM) dos extratos obtidos frente a bactérias orais;
- Determinar a seletividade dos extratos frente aos microrganismos testados;
- Caracterizar o perfil de degradação térmica dos extratos
- Caracterizar os compostos presentes no extrato que apresentar a melhor atividade antimicrobiana;

3. METODOLOGIA

3.1. PREPARAÇÃO DOS EXTRATOS DE *Schinopsis brasiliensis* ENGL.

3.1.1. Obtenção e identificação do material vegetal

A coleta da casca do caule da *Schinopsis brasiliensis* Engl. foi realizada na região semiárida no Estado da Paraíba. A exsicata foi preparada e identificada no herbário Professor Jayme Coelho de Moraes (PRU), localizado na Universidade Federal de Campina Grande, sobre o número EAN-14049.

3.1.2. Preparo dos extratos

A casca do caule da *Schinopsis brasiliensis* Engl. foi dessecada em estufa com ar circulante à temperatura média de 40°C, durante cinco dias, sendo em seguida submetidas a um processo de pulverização em moinho mecânico de facas, para sua redução à pó. Após seco e pulverizado, o material vegetal foi submetido à extração por dois diferentes métodos: maceração e assistida por ultrassom. Foram obtidos três extratos. O primeiro foi etanólico obtido por percolação durante 15 dias. O segundo foi hidroalcolólico (água:etanol – 30:70) também obtido por percolação durante 15 dias. O terceiro também foi hidroalcolólico (água:etanol – 30:70) obtido através da extração assistida por ultrassom por 15 minutos. Então, os extratos hidroalcolólicos foram concentrados em evaporador rotativo a vácuo (40 °C, 55 rpm) até atingir uma concentração de álcool inferior a 50%. Ao passo em que o extrato etanólico foi concentrado até remoção total do solvente.

3.1.3. Partição líquido-líquido do extrato etanólico

O Extrato Etanólico (EE) foi submetido ao fracionamento líquido-líquido. Para isso foi solubilizado em um sistema de solvente etanol:água (80:20, v/v), na proporção 1:1 (m/v). A solução de EE foi colocada em um funil de separação e os solventes (Hexano - Hex, Clorofórmio – Clo e Acetato de Etila – AcEt) foram adicionados sequencialmente na proporção 1:1 (v/v) e agitados. A solução foi deixada em repouso por aproximadamente 10 minutos, para que houvesse a separação das fases. O processo foi repetido três vezes para cada solvente, para obtenção da quantidade adequada de cada fração. Em seguida, cada fração foi concentrada em evaporador rotativo a vácuo (40 °C, 55 RPM), até remoção total do solvente.

3.2. CARACTERIZAÇÃO QUÍMICA DOS EXTRATOS

3.2.1. Triagem Fitoquímica

3.2.1.1. Determinação do teor de polifenóis totais

Para a determinação do teor de polifenóis totais, utilizou-se o método descrito por Chandra e Mejía (2004). Dessa forma, adicionou-se 1mL da solução aquosa do extrato a 1mL do reagente de Folin-Ciocalteu 1N, e esta mistura permaneceu em repouso por 2 minutos. Em seguida, adicionou-se 2mL de uma solução aquosa de Na_2CO_3 a 20% (p/v), e a mistura permaneceu em repouso por mais 10 minutos. Em seguida, foi realizada a leitura da absorbância a 757 nm em espectrofotômetro (Shimadzu® UV mini – 1240), contra um branco composto por água destilada, reagente de Folin-Ciocalteu e solução a 20% de Na_2CO_3 .

Para a obtenção da curva analítica, uma solução padrão de $100 \mu\text{g}.\text{mL}^{-1}$ de ácido gálico foi preparada pela dissolução de 10 mg do padrão em 100 mL de água destilada. A partir dessa solução foram feitas diluições em triplicata, de forma a obter soluções de 1, 3, 6, 9, 12, 15, 20, 25, 30, 35, e $40 \mu\text{g}.\text{mL}^{-1}$. A concentração de polifenóis foi expressa em miligramas equivalentes de ácido gálico. As análises foram realizadas em triplicata.

3.2.1.2. Determinação do teor de Flavonoides

A determinação do conteúdo de flavonoides totais seguiu o método de Meda et al (2005). A 5 mL de cada solução (em metanol) do extrato foi adicionado o mesmo volume de uma solução (em metanol) de AlCl_3 a 2% (p/v). A mistura permaneceu em repouso por 10 minutos antes da leitura da absorbância a 415 nm, contra um branco composto pela solução de AlCl_3 .

A curva de calibração foi obtida a partir de uma solução padrão a $100 \mu\text{g}.\text{mL}^{-1}$, preparada pela dissolução de 10 mg de quercetina em 100 mL de metanol. A partir dessa solução, foram feitas diluições em triplicata, obtendo-se soluções de quercetina nas concentrações de 2, 4, 6, 8, 10, 13, 16, 19, 22, 26, 28 e $30 \mu\text{g}.\text{mL}^{-1}$. A concentração de flavonoides foi expressa em miligramas equivalentes de quercetina. As análises foram realizadas em triplicata.

3.2.1.3. Determinação do teor de Taninos Condensados

O teor de taninos condensados foi quantificado utilizando-se o método de Makkar e Becker (1993), no qual 0,5 mL da amostra do extrato vegetal foi adicionado a 3 mL de uma solução de vanilina (4% p/v em metanol); em seguida, adicionou-se 1,5 mL de HCl concentrado (37%). A reação ocorreu em tubos de ensaio, mergulhados em água a cerca de 22°C. A leitura foi feita a 500 nm, contra um branco composto pela solução de vanilina, HCl e uma solução de etanol 50% (v/v) em água.

A curva de calibração para este ensaio foi obtida a partir de uma solução padrão de catequina obtida pela dissolução de 10 mg do padrão em 100 mL de metanol. A partir dessa solução, foram realizadas diluições em triplicata, de forma a obter soluções de catequina nas concentrações de 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90 e 100 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$. A concentração de taninos condensados foi expressa em miligramas equivalentes de catequina. As análises foram realizadas em triplicata.

3.2.2. Determinação e Quantificação do composto majoritário

Cada amostra foi analisada por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) para quantificação do ácido gálico. As análises seguiram a metodologia descrita por Schieber; Keller; Carle (2001), com algumas modificações. O teste cromatográfico foi realizado em um equipamento Shimadzu, com detector arranjo de diodos (modelo SPD-M10A), em uma coluna C-18 (Phenomenex Gemine – 4.6 mm x 250 mm x d.i. 3 μm) em um fluxo de 1,0 $\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$. A análise foi realizada utilizando comprimento de onda de 272 nm. A coluna foi operada a uma temperatura de 30 °C. A fase móvel utilizada foi ácido fórmico 1% : metanol – 90:10 (v/v). O volume de injeção das amostras foi 10 μL .

3.2.3. Cromatografia Gasosa (GC)/Espectrometria de Massa

Caracterizou-se por GC apenas a fração que apresentou melhor atividade antimicrobiana nos testes microbiológicos. A análise de Cromatografia Gasosa/Espectrometria de Massa (GC/MS) foi realizada em um sistema HP-5890/5970 equipado com um J&W Scientific CPSIL 24 CB e uma coluna de capilar (30 m x 0,25 mm x 0,25m). Programa de temperatura: 150 °C (2 min); (5 °C $\cdot\text{min}^{-1}$); 240 °C; (10 °C $\cdot\text{min}^{-1}$); 300 °C (34min). Temperatura do injetor: 280 °C; temperatura do detector: 300 °C. O gás de arraste foi o Hélio (0,7 bar, 1 $\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$). A Espectrometria de Massa foi

realizada a 70 eV. A velocidade de leitura foi de 0,84 leituras por segundo, de 40 a 550 unidades de massa atômica. Foi injetado 1 mL de cada amostra.

3.3. PRODUÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DAS MICROPARTÍCULAS

3.3.1. Produção das Micropartículas

Foi utilizado uma solução de quitosana a 1% (m/v), preparada a partir de uma solução aquosa de ácido acético a 1% (v/v), em uma proporção de 3 partes do extrato para 1 da solução (3:1 v/v). A solução foi seca em um aparelho *Spray Dryer* (MSD 0.5, Labmaq do Brasil Ltda.) com a finalidade de se produzir as micropartículas, com temperatura de entrada do ar de 100 °C e vazão do ar comprimido de 45L.h⁻¹. O único parâmetro que teve variação foi a vazão da bomba, pois esta modifica o tamanho das micropartículas obtidas. Dessa maneira, as soluções sofreram três variações da vazão de fluxo, resultando na micropartícula 5 (vazão de 0,50 mL.min⁻¹), micropartícula 4 (vazão de 0,40 mL.min⁻¹) e micropartícula 3 (vazão de 0,30 mL.min⁻¹).

3.3.2. Eficiência de Encapsulação

Para avaliar a eficiência de encapsulação (EE) do processo, foram pesados 100 mg de cada amostra e lavado com 10 mL de água destilada para solubilizar o extrato que ficou no exterior da micropartícula (S), sem quebra-la, e outros 100 mg das amostras foram lavados com 10 mL de metanol para quebrar as micropartículas (T). Após essa etapa, cada amostra foi centrifugada a 2500 RPM por 10 minutos. A leitura do sobrenadante foi realizada em uma absorvância de 510 nm em espectrofotômetro (Shimadzu® UV mini – 1240). O experimento foi realizado em triplicata, sendo o teste realizado em dias consecutivos, totalizando nove leituras de cada amostra. A EE foi calculada segundo a equação abaixo, proposta por Barbosa et al (2005), conforme equação abaixo:

$$EE = \frac{(T - S)}{T} \times 100$$

Utilizou-se o software *Statistical Package for Social Science* 21.0 para realizar o teste de Kruskal-Wallis para verificar se houve diferença estatisticamente significativa entre as absorvâncias de cada vazão. Constatada essa diferença, realizou-se o teste de

Mann-Whitney com penalização de Bonferroni para identificar entre quais grupos estava essa diferença.

3.4. ANÁLISE MICROBIOLÓGICA DOS EXTRATOS DE *Schinopsis brasiliensis* ENGL.

3.4.1. Linhagens Bacterianas

Para essa etapa foram utilizadas cepas padrão *American Type Culture Collection* (ATCC) de *Streptococcus mutans* (25175), *Streptococcus oralis* (10557), *Streptococcus mitis* (903), *Streptococcus salivarius* (7073), *Staphylococcus aureus* (25923) e *Enterococcus faecalis* (ATCC 29219), as quais foram disponibilizadas pela Fundação Oswaldo Cruz (FIOCRUZ – RJ), bem como um *Enterococcus faecalis*, isolado clínico, proveniente do meio bucal (MB 147), disponibilizado pela Divisão de Microbiologia do CPQBA-Unicamp.

3.4.2. Determinação da concentração inibitória mínima dos extratos de *Schinopsis brasiliensis* Engl.

A determinação da concentração inibitória mínima (CIM) foi realizada de acordo com a metodologia proposta pelo *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI, 2012), com algumas modificações. O inóculo foi padronizado em tubos contendo 5 mL de solução salina a 0,9% estéril. A suspensão microbiana foi ajustada em espectrofotômetro, no comprimento de onda de 625 nm, a qual equivalente a 10^6 UFC/mL. Para essa etapa, as frações e o extrato foram solubilizados em DMSO 10%. Cem microlitros do extrato ou de cada fração na concentração de $1,0 \text{ mg.mL}^{-1}$ foi diluído em série com caldo *Brain Heart Infusion* (BHI), em uma placa de 96 poços, assim como o controle positivo (Clorexidina a 0,12% - Sigma-Aldrich). Dez microlitros do inóculo com o microrganismo foi adicionado nos poços. As placas foram incubadas a $37 \pm 0,5 \text{ }^\circ\text{C}$, por 24 horas. O crescimento bacteriano foi indicado pela adição de $20 \text{ }\mu\text{L}$ da solução aquosa de resazurina® (Sigma-Aldrich) a 0,01% com posterior incubação a $37 \pm 0,5 \text{ }^\circ\text{C}$, por duas horas. Bactérias viáveis reduzem o corante, mudando sua coloração para azul e a CIM foi definida como a menor concentração da substância que inibiu a mudança de coloração da resazurina®.

3.4.3. Estudo bioguiado pela atividade antimicrobiana frente a *Enterococcus faecalis*

Após a realização da CIM, selecionou-se a bactéria isolada do ambiente bucal, devido a maior resistência apresentada frente às amostras testadas, para determinação da atividade antimicrobiana dos extratos pelo método de bioautografia, de acordo com Slusarenko et al., (1989) em placas de cromatografia em camada delgada (CCD) eluídas em um sistema de solvente de Diclorometano:Metanol (98,5:1,5 – v/v). Após dissolução das amostras em acetato de etila, aplicou-se 3 μL de cada amostra na concentração de 20 $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ nas placas de CCD, em triplicata. Uma das placas foi revelada com anisaldeído e as outras duas foram submetidas aos ensaios de bioautografia. O inóculo de *E. faecalis* (MB 146) foi padronizado segundo método da CLSI para concentração inicial de 10^8 $\text{UFC}\cdot\text{mL}^{-1}$. A suspensão de microrganismos foi inoculada pela técnica de *pour plate* no meio nutriente ágar, utilizando-se a proporção de 1:1000 (v/v). Uma alíquota de 0,5 mL de solução de cloreto de trifetil tetrazolium na concentração de 1,0 $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ foi adicionada ao meio inoculado, como indicador da atividade respiratória das células. Em seguida, o meio foi vertido em placas de Petri contendo as placas de CCD, as quais foram aplicadas as amostras previamente. Após homogeneização, o material foi incubado a 37 °C durante 24 horas. A mudança de coloração do meio para vermelho indicou crescimento bacteriano. Do mesmo modo, a formação de halos de inibição permitiu identificar a localização dos compostos bioativos frente à cepa testada. Como o teste é qualitativo, não é necessário mensurar o tamanho do halo de inibição.

3.4.4. Separação de compostos da fração hexânica

Para separação dos compostos, optou-se pelo método da Cromatografia em Coluna, o qual 500 mg da fração hexânica foi misturado a 1,5 g de sílica, solubilizados em metanol. O solvente foi então retirado em evaporador rotativo a vácuo e o pó obtido foi homogeneizado. Adicionou-se 15 g de sílica em um funil de Buchner e, em seguida, a amostra homogeneizada. Então, iniciou-se a passagem dos sistemas de solvente, conforme quadro 1. As amostras foram coletadas em frascos separados e uma CCD de cada fração retirada foi realizada para observar o perfil de cada uma delas, utilizando como eluente o mesmo sistema utilizado para o ensaio de bioautografia. As amostras cromatograficamente semelhante foram agrupadas.

Quadro 1: Sistemas de solvente utilizados para realização da Cromatografia em Coluna.

Ordem	Hexano (%)	Diclorometano (%)	Metanol (%)
1	100	0,0	0,0
2	80,0	2,00	0,0
3	60,0	40,0	0,0
4	40,0	60,0	0,0
5	20,0	80,0	0,0
6	0,0	100	0,0
7	0,0	99,5	0,5
8	0,0	99,0	1,0
9	0,0	98,5	1,5
10	0,0	98,0	2,0
11	0,0	97,5	2,5
12	0,0	97,0	3,0
13	0,0	96,5	3,5
14	0,0	96,0	4,0
15	0,0	95,5	4,5
16	0,0	95,0	5,0
17	0,0	0,0	100

3.5. CITOTOXICIDADE EM ERITRÓCITOS E ÍNDICE DE SELETIVIDADE

A preparação das hemácias para o teste de citotoxicidade seguiu a metodologia descrita por Cruz-Silva et al (2000), com algumas modificações. O sangue doado pelo laboratório de Análises Clínicas da UEPB foi acondicionado em tubo com heparina. O plasma foi retirado após centrifugação a 2500 rpm por 5 minutos. Posteriormente, a suspensão de hemácias foi lavada com solução salina 1% três vezes. As hemácias foram ressuspensas com a mesma solução e o volume foi ajustado para 5%. Então, colocou-se 1,5 mL da suspensão de hemácia a 5% juntamente com 1,5 mL das soluções teste nas concentrações de 1,0, 2,5 e 5,0 mg.mL⁻¹ em tubos de ensaio, os quais foram deixados em repouso durante 1 hora a temperatura ambiente para que acontecesse a hemólise. Após esse período, cada tubo foi centrifugado a 2500 RPM por 10 minutos, sendo o sobrenadante retirado para leitura em espectrofotômetro (Shimadzu® UV mini – 1240) em um comprimento de onda de 540 nm (CRUZ-SILVA et al, 2001). O controle positivo utilizado foi a solução de Turk 1% e o negativo a solução salina 1%. A análise foi feita em triplicata. O potencial hemolisante das substâncias em cada concentração foi calculado conforme equação abaixo:

$$Ph = \frac{Ae - Ab}{At} \times 100$$

Onde:

Ph = Potencial hemolisante (em porcentagem)

Ae = Absorbância da amostra testada

Ab = Branco da amostra testada

At = Absorbância do Controle Positivo

A partir da curva de linearidade gerada com os dados de cada amostra, foi possível determinar a concentração necessária de cada extrato para causar hemólise de 50 % das hemácias (IC_{50}). Esse dado foi utilizado para determinar o Índice de Seletividade (IS) de cada extrato frente às bactérias testadas, calculado segundo a metodologia proposta por Protopopova et al (2005), através da equação:

$$IS = \frac{IC_{50}}{CIM}$$

Onde:

IS = Índice de Seletividade

IC_{50} = Concentração das Amostras capaz de causar hemólise em 50 % das hemácias

CIM = Concentração Inibitória Mínima frente ao microrganismo teste

3.6. ANÁLISE TÉRMICA

3.6.1. Termogravimetria e Análise Térmica Diferencial

As curvas de termogravimetria (TG) e análise térmica diferencial (DTA) foram realizadas utilizando um DTG-60 (Shimadzu). Amostras foram aquecidas em uma taxa de aquecimento de $10 \text{ }^\circ\text{C}\cdot\text{min}^{-1}$, com uma variação de temperatura de $25 \text{ }^\circ\text{C}$ a $900 \text{ }^\circ\text{C}$, em uma atmosfera de nitrogênio. As amostras foram acondicionadas em um cadinho de alumina, contendo aproximadamente 7,0 mg de amostra.

4. RESULTADOS

Como descrito anteriormente, o presente trabalho foi dividido em três artigos. Assim, os resultados serão apresentados conforme a apresentação de cada artigo.

ARTIGO 1

Periódico: Archives of Oral Biology

Fator de Impacto: 1,880/ Qualis Odontologia A2

Artigo formatado segundo as normas de publicação do periódico (ANEXO A)

Determinação do composto majoritário, citotoxicidade, atividade antibacteriana e perfil de degradação térmica de frações do extrato de *Schinopsis brasiliensis* Engl.

Pedro Henrique Sette-de-Souza^{a,d}, Alinne S. Barbosa^a, Mary Ann Foglio^b, Francinalva D. de Medeiros^a, Ilza Maria de Oliveira Sousa^b, Jocimar da S. Santos^a, Cleildo P. Santana^a, Edja Maria M. de B. Costa^d, Pedro Luiz Rosalen^c, Ana Cláudia D. Medeiros^{a,d*}

^a Laboratório de Desenvolvimento e Ensaio de Medicamentos, Universidade Estadual da Paraíba. Campina Grande, Paraíba, 58429-500, Brasil. *E-mail: anaclaudia@uepb.edu.br

^b Centro Pluridisciplinar de Pesquisas Químicas, Biológicas e Agrícolas, Universidade Estadual de Campinas. Campinas, São Paulo, 13081-970, Brasil

^c Departamento de Farmacologia e Anestesiologia, Faculdade de Odontologia de Piracicaba, Universidade Estadual de Campinas. Piracicaba, São Paulo, 13414-903, Brasil.

^d Programa de Pós-Graduação em Odontologia, Universidade Estadual da Paraíba. Campina Grande, Paraíba, 58429-500, Brasil.

*Autor correspondente

Laboratório de Desenvolvimento e Ensaio de Medicamentos, Universidade Estadual da Paraíba. Rua das Baraúnas, 351, Bairro Universitário. Campina Grande-PB, Brasil – CEP: 58429-500. E-mail: anaclaudia@uepb.edu.br

Tel: + 55 83 3315 3300 (Ext. 3516)

Resumo

Objetivo: Avaliar a atividade antimicrobiana e citotoxicidade de extratos produzidos com a casca da *Schinopsis brasiliensis* Engl. frente a cinco microrganismos orais, bem como analisar o seu perfil fitoquímico e de degradação térmica. **Desenho:** A partição líquido-líquido foi realizada com hexano, clorofórmio e acetato de etila. A identificação e quantificação do marcador químico foi realizado através da Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) com comprimento de onda de 272 nm em uma fase móvel de ácido fórmico 1% : metanol – 90:10 (v/v). A ação antimicrobiana foi avaliada com base na concentração inibitória mínima (CIM). Já o potencial citotóxico foi analisado com base no potencial hemolisante e do índice de seletividade (IS) das amostras. Para as curvas de termogravimetria (TG) e análise térmica diferencial (DTA) as amostras foram aquecidas em uma taxa de aquecimento de 10 °C.min⁻¹, de 25 °C a 900 °C, em uma atmosfera de nitrogênio. **Resultados:** O ácido gálico foi identificado como composto majoritário das amostras e apresentou a maior quantidade na fração clorofórmio (52,02 mg/g). Todas as amostras foram capazes de inibir o crescimento dos microrganismos testados em uma concentração ≤ 1.000 mg/mL e não apresentaram citotoxicidade com IS superior a 22. O extrato etanólico absorve menos calor do que as suas frações. Todas as amostras apresentam pico exotérmico compatível com a degradação do ácido gálico. **Conclusão:** Com base nos resultados encontrados, extrato etanólico da casca de *Schinopsis brasiliensis* Engl e suas frações são potenciais candidatos para ser utilizado em formulações odontológicas de controle do biofilme dentário.

Palavras-chave: Ácido Gálico; Análise Térmica Diferencial; Agentes Antibacterianos, Produtos Naturais.

1. INTRODUÇÃO

A resistência de microrganismos aos antibióticos se tornou um grande problema para a medicina, que busca novas terapêuticas para desenvolver antimicrobianos com baixa resistência pelos microrganismos¹. Por isso, a pesquisa com produtos fitoterápicos vem crescendo gradativamente. Na odontologia, essas pesquisas visam, principalmente, o efeito desses produtos sobre bactérias e fungos aos agravos bucais mais prevalentes, como cárie e doença periodontal²⁻⁴.

A *Schinopsis brasiliensis* Engl., popularmente conhecida como braúna, quebracho ou chamacoco, é uma árvore endêmica do Brasil. É utilizada na medicina tradicional para o combate de diversas doenças⁵⁻¹⁰. Santos et al.¹¹ detectaram a presença de flavonoides e taninos no extrato hidroalcoólico da casca da *S.brasiliensis* Engl., bem como a ausência de toxicidade. Esses compostos fenólicos presentes na casca desta planta são degradados em temperaturas acima de 125°C¹².

Assim, o objetivo desse estudo foi avaliar a atividade antimicrobiana e citotoxicidade do extrato etanólico e suas frações produzidas com a casca da *S. brasiliensis* Engl. frente a microrganismos orais, bem como analisar o seu perfil fitoquímico e de degradação térmica.

2. MATERIAIS E MÉTODOS

2.1. Coleta do Material vegetal e Obtenção do Extrato

A casca da *Schinopsis brasiliensis* Engl. foi coletada na região do semiárido do Estado da Paraíba, Brasil. A exsicata foi preparada e identificada no herbário Professor Jayme Coelho de Moraes, da Universidade Federal da Paraíba com número EAN-14049.

O material vegetal foi seco a 40 ± 1 °C. O extrato etanólico (EE) foi obtido por percolação do pó da casca, utilizando o etanol como solvente por cinco dias, em três ciclos, e concentrado em evaporador rotativo à vácuo (40 °C, 55 RPM) até total remoção do solvente.

2.2. Fracionamento do extrato etanólico

O EE foi submetido ao fracionamento líquido-líquido. Para isso foi solubilizado em um sistema de solvente etanol:água (80:20, v/v), na proporção 1:1 (m/v). A solução de EE foi colocada em um funil separador e os solventes (Hexano - Hex, Acetato de Etila -

AcEt, e Clorofórmio - Clo) foram adicionados sequencialmente na proporção 1:1 (v/v) e agitados. O funil foi deixado em repouso por aproximadamente 10 minutos, para que houvesse a separação das fases. O processo foi repetido três vezes para cada solvente, para obtenção da quantidade adequada de cada fração. Em seguida, cada fração foi concentrada em evaporador rotativo a vácuo (40 °C, 55 RPM), até remoção total do solvente.

2.3. Concentração Inibitória Mínima

Para essa etapa foram utilizadas cepas padrão *American Type Culture Collection* (ATCC) de *Streptococcus mutans* (25175), *Streptococcus oralis* (10557), *Streptococcus mitis* (903), *Streptococcus salivarius* (7073) e *Staphylococcus aureus* (25923), as quais foram disponibilizadas pela Fundação Oswaldo Cruz (FIOCRUZ-RJ).

A determinação da concentração inibitória mínima (CIM) foi realizada conforme preconizado pelo *Clinical and Laboratory Standards Institute*¹³. O inóculo foi padronizado em tubos contendo 5 mL de solução salina a 0,9% estéril. A suspensão microbiana foi ajustada em espectrofotômetro, no comprimento de onda de 625 nm, a qual equivalente a 10⁶ UFC/mL. Para essa etapa, as frações e o extrato foram solubilizados em DMSO 10%. Cem microlitros do extrato ou de cada fração na concentração de 500 mg/mL foi diluído em série com caldo *Brain Heart Infusion* (BHI), em uma placa de 96 poços, assim como o controle positivo (Clorexidina a 0,12% - Sigma-Aldrich). Dez microlitros do inóculo com o microrganismo foi adicionado nos poços. As placas foram incubadas a 37 ± 0,5 °C, por 24 horas. O crescimento bacteriano foi indicado pela adição de 20 µL da solução aquosa de resazurina (Sigma-Aldrich) a 0,01% com posterior incubação a 37 ± 0,5 °C, por duas horas. Bactérias viáveis reduzem o corante, mudando sua coloração para azul e a CIM foi definida como a menor concentração da substância que inibiu a mudança de coloração da resazurina.

2.4. Citotoxicidade em Hemácias e Índice de Seletividade

A preparação das hemácias para o teste de citotoxicidade seguiu a metodologia descrita por Cruz-Silva et al.¹⁴ com algumas modificações. O sangue foi doado pelo laboratório de Análises Clínicas da UEPB e acondicionado em tubo com heparina. O plasma foi retirado após centrifugação a 2500 rpm por 5 minutos. Posteriormente, a

suspensão de hemácias foi lavada com solução salina 1% três vezes. As hemácias foram ressuspendidas com a mesma solução e o volume foi ajustado para 5%. Então, colocou-se 1,5 mL da suspensão de hemácia a 5% juntamente com 1,5 mL das soluções teste nas concentrações de 1,0 mg/mL, 2,5 mg/mL e 5,0 mg/mL em tubos de ensaio, aguardando 1 hora a temperatura ambiente para que acontecesse a hemólise. Após esse período, cada tubo foi centrifugado a 2500 RPM por 10 minutos, sendo o sobrenadante retirado para leitura em espectrofotômetro (Shimadzu® UV mini – 1240) em um comprimento de onda de 540 nm¹⁵. O controle positivo utilizado foi a solução de Turk 1% e o negativo a solução salina 1%. A análise foi feita em triplicata. O cálculo do potencial hemolisante das substâncias em cada concentração seguiu a seguinte equação:

$$Ph = \frac{Ae - Ab}{At} \times 100$$

Onde:

Ph = Potencial hemolisante (em porcentagem)

Ae = Absorbância da amostra testada

Ab = Branco da amostra testada

At = Absorbância do Controle Positivo

A partir da curva de linearidade gerada com os dados de cada amostra, foi possível determinar a concentração necessária de cada extrato para causar hemólise de 50% das hemácias (IC₅₀). Esse dado foi utilizado para determinar o Índice de Seletividade (IS) de cada extrato frente às bactérias testadas, calculado segundo a metodologia proposta por Protopopova et al.¹⁶, através da equação:

$$IS = \frac{IC_{50}}{CIM}$$

Onde:

IS = Índice de Seletividade

IC₅₀ = Concentração das Amostras capaz de causar hemólise em 50 % das hemácias

CIM = Concentração Inibitória Mínima frente ao microrganismo teste

2.5. Screening Fitoquímico

Para a determinação do conteúdo de flavonoides totais seguiu o método proposto por Meda et al.¹⁷. Adicionou-se ao extrato uma solução de cloreto de alumínio (AlCl₃) a 2% diluído em metanol. Aguardou-se o tempo de 10 minutos e realizou-se a leitura da absorbância a 415 nm em espectrofotômetro (Shimadzu® UV mini – 1240). A curva de

calibração foi obtida a partir de soluções de quercetina. A concentração de flavonoides foi expressa em miligramas equivalentes de quercetina.

Já a quantificação de taninos totais foi feita através da metodologia proposta por Makkar e Becker¹⁸. Adicionou-se ao extrato uma solução de vanilina 4% (m/v) em metanol. Em seguida, adicionou-se 1,5 mL de HCl concentrado (37%). A leitura foi realizada com absorvância de 500 nm em espectrofotômetro. O resultado foi determinado pela interpolação da absorvância das amostras contra uma curva de calibração construída com os padrões de catequina e expresso como mg de equivalentes de catequina por g de extrato.

Por fim, para determinar o teor de polifenóis totais, foi utilizado o método descrito por Chandra e Mejía¹⁹, sendo adicionada solução aquosa do extrato ao reagente de Folin-Ciocalteu 1N. Após 2 minutos, adicionou-se a solução aquosa de carbonato de sódio (Na_2CO_3) a 20%, permanecendo assim por mais 10 minutos. Logo após, foi realizada a leitura da absorvância a 757 nm em espectrofotômetro. A curva de calibração foi obtida a partir de soluções de ácido gálico. A concentração de polifenóis foi expressa em miligramas equivalentes de ácido gálico.

Todas as análises foram realizadas em triplicata.

2.6. Identificação e Quantificação do Marcador Químico

Cada amostra foi analisada por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) para quantificação do ácido gálico. As análises seguiram a metodologia descrita por Schieber, Keller e Carle²⁰, com algumas modificações. O teste cromatográfico foi realizado em um equipamento Shimadzu, com detector arranjo de diodos (modelo SPD-M10A), em uma coluna C-18 (Phenomenex Gemine – 4.6 mm x 250 mm x d.i. 3 μm) em um fluxo de 1,0 mL.min⁻¹. A análise foi realizada utilizando comprimento de onda de 272 nm. A coluna foi operada a uma temperatura de 30 °C. A fase móvel utilizada foi ácido fórmico 1% : metanol – 90:10 (v/v). O volume de injeção das amostras foi 10 μL .

2.7. Análise Térmica

As curvas de termogravimetria (TG) e análise térmica diferencial (DTA) foram realizadas utilizando um DTG-60 (Shimadzu). Amostras foram aquecidas em uma taxa

de aquecimento de $10\text{ }^{\circ}\text{C}\cdot\text{min}^{-1}$, de $25\text{ }^{\circ}\text{C}$ a $900\text{ }^{\circ}\text{C}$, em uma atmosfera de nitrogênio, em um cadinho de alumina, contendo aproximadamente $7,0\text{ mg}$ de amostra.

3. RESULTADOS

3.1. Concentração Inibitória Mínima, Citotoxicidade e Índice de Seletividade

Na tabela 1 é possível a visualização de que todas as amostras foram capazes de inibir o crescimento dos microrganismos testados, bem como a ausência de citotoxicidade também esteve presente em todas as amostras (tabela 1).

3.2. Screening Fitoquímico

A tabela 2 mostra os resultados da caracterização fitoquímica quantitativa obtida com o extrato e frações de *S. brasiliensis* Engl.

3.3. Identificação do Marcador Químico

Na determinação fitoquímica quantitativa do extrato e frações de *S. brasiliensis* Engl. foi detectada a presença de grandes quantidades de polifenóis. Com base neste resultado foi escolhido o ácido gálico como marcador e procedeu-se a sua quantificação nas amostras analisadas. Em todas as amostras analisadas é observada a presença majoritária do ácido gálico, cujo tempo de retenção está próximo a $4,0$ minutos (Figura 1).

Segundo a curva padrão ($y = 61635x - 11502$; com $R^2 0,9957$), a fração clorofórmio foi a que apresentou a maior quantidade de ácido gálico ($52,02\text{ mg}\cdot\text{g}^{-1}$), seguida da fração acetato de etila ($50,39\text{ mg}\cdot\text{g}^{-1}$) e pelo extrato etanólico ($15,56\text{ mg}\cdot\text{g}^{-1}$). A amostra que obteve menor quantidade de ácido gálico foi a fração hexano ($6,51\text{ mg}\cdot\text{g}^{-1}$).

3.4. Análise Térmica

As curvas da TG e DTA do extrato etanólico, das frações e do ácido gálico podem ser visualizadas na figura 2 e 3. Os picos de cada evento estão descritos na tabela 3.

4. DISCUSSÃO

Todos os extratos testados apresentaram valores de CIM frente às bactérias testadas maior do que o controle positivo (clorexidina 0,12%). Segundo Castro et al.²¹, isso pode ser explicado pelo fato de que os produtos naturais apresentam compostos biológicos diluídos na amostra, enquanto a clorexidina é uma droga sintética. Contudo, é importante destacar que a clorexidina possui efeitos adversos que restringem o período de utilização. Em uma recente revisão sistemática, Haas et al.²² mostraram que a clorexidina apresentou bons resultados na redução do biofilme e da gengivite, entretanto, devem ser indicados para tratamentos curtos, pelos seus efeitos adversos, sendo os agentes a base de produtos naturais mais indicados para o uso diário. Portanto, a fração hexânica de *S. brasiliensis* Engl apresenta-se como potencial agente para ser incorporado a produtos preventivos e terapêuticos na Odontologia, tendo em vista sua atividade frente à *Streptococcus mitis* e *Streptococcus oralis*, responsáveis pela colonização inicial da superfície dentária, e contra *S. mutans*, que é o principal responsável pela iniciação/progressão da cárie dentária. Além disso, Duarte et al.,²³ já relataram a atividade de compostos fenólicos frente ao *Streptococcus mutans* organizado em biofilme, sendo, portanto, mais uma justificativa para o uso de do extrato na área.

Nenhuma amostra apresentou citotoxicidade na concentração testada, o que também foi observado por Santos et al.,¹¹. Segundo Bézivin et al.,²⁴ o IS indica quantas vezes o produto testado é mais eficaz frente a determinados alvo do que a células humanas. Para o composto ser considerado um protótipo ideal de um novo fármaco, espera-se que o IS apresentado seja maior ou igual a 10^{16} . De acordo com Reimão et al.,²⁵, quanto maior o valor numérico do IS do composto em estudo, mais tóxico ele é para os microrganismos e menos tóxico para as células. Como o IS de todas as amostras testadas foram superior ao estabelecido por esses autores, os achados dessa pesquisa são importantes na busca por desenvolvimento de produtos naturais, tendo em vista que a baixa toxicidade é uma característica interessante, alinhada a satisfatória atividade antimicrobiana apresentada.

Outros estudos que apresentam o fracionamento de extrato da *S. brasiliensis* Engl. mostraram que há separação de fitocompostos quando se aumenta a polaridade¹¹. Nenhuma fração estudada apresentou taninos equivalentes à catequina, diferentemente

do extrato bruto que teve 15,83 mg/g. Isso pode ter relação com a polaridade de cada solvente utilizado, o que possivelmente acarretou na não extração dos compostos com polaridade semelhante à catequina. O que não significa dizer que em extratos e frações produzidos com casca de *S. brasiliensis* Engl. não contenham taninos. Já a quantidade de flavonoides encontrada em cada fração foi maior do que a encontrada no extrato bruto, isso se dá provavelmente devido a polaridade dos solventes orgânicos terem similaridade com o padrão utilizado. Em seu estudo, Santos et al.,¹¹ observaram, qualitativamente, a presença de auronas, catequinas, chalconas, flavononas, saponinas e taninos na fração acetato de etila, enquanto que na fração hexânica e na clorofórmica foi identificado apenas esteroides e triterpenos, respectivamente. Diferentemente do nosso estudo, esses autores não quantificaram os compostos, apenas observaram a presença total ou ausência, sem utilizar um padrão do composto, o que pode ter gerado esses resultados divergentes na fração de acetato de etila. Além disso, quando se trabalha com produtos naturais e seus compostos, é preciso levar em consideração fatores que influenciam a produção de metabólitos secundários pela planta, como o período em que o farmacógeno foi coletado, sazonalidade pluviométrica, possíveis predadores naturais, etc²⁶⁻²⁸. Assim, é possível explicar essas diferenças tendo em vista que aqueles autores coletaram partes da *S. brasiliensis* em outra região e em outro período do que aconteceu a nossa coleta.

Na curva DTA se observa que o extrato etanólico absorve menos calor do que as suas frações. Todas as amostras apresentam um pico endotérmico na faixa entre 85,0 a 130,0 °C compatível com a perda de umidade, água e/ou solvente volátil utilizado em cada sistema. Já a curva da TG do EE apresenta quatro eventos de decomposição térmica. O primeiro, que está situado na faixa de 30,0 até 86,9°C está relacionado com a perda de água e solvente do extrato, já que a perda de massa foi aproximadamente de 4,55% do total da amostra. O segundo evento (87,0 – 202,8°C) pode estar relacionado com a degradação dos compostos fitoquímicos encontrados na amostra, como os taninos e flavonoides, tendo uma perda de massa equivalente a 21,5% (1,33 mg). Já o terceiro evento (228,7 – 271,1 °C) pode se relacionar a degradação do ácido gálico presente na amostra, tendo em vista que esse intervalo de temperatura coincide com a segunda etapa de degradação desse fenol chegando a perder 18,9% do total da massa da amostra (1,57 mg). A última etapa da degradação corresponde a carbonização dos compostos

residuais. A curva da fração clorofórmio é bastante semelhante a do extrato bruto, sendo, inclusive, a amostra com o perfil mais próximo a este extrato, tanto nos picos de decomposição térmica, quanto no percentual de massa perdida em cada etapa.

A curva da TG da fração acetato de etila mostra cinco etapas distintas de decomposição térmica. A primeira situada entre 29,3 a 123,2 °C assemelha-se à encontrada no extrato bruto. Contudo, além da perda de umidade e solvente residual da fração, provavelmente há perda de algum outro composto. O segundo evento, que acontece entre 123,2 e 188,2 °C pode ter relação com a degradação dos flavonoides encontrados na amostra. O terceiro evento de degradação provavelmente está relacionado com a degradação do ácido gálico presente, equivalente a 26,42 % de perda de massa (1,76 mg), uma vez que o pico de degradação do ácido gálico ocorre por volta de 263°C em um evento exotérmico. Ainda notam-se eventos que acontecem entre 287,8-511,6 °C e 511,6 - 634,5 °C.

A curva da TG da fração hexano é a única que apresenta dois fenômenos de degradação. O primeiro ocorre entre 29,7 a 152,5 °C que pode ser relacionado à perda de umidade e solvente residual da fração, equivalente a 5,32 % do total da sua massa. A segunda, entre 214,5 e 266,2 °C, apresenta uma perda de massa de 31,6 %, e juntamente com a terceira etapa (267,2 - 372,1 °C) degrada praticamente toda a amostra (73,6 %). As etapas seguintes representam apenas a carbonização dos resíduos.

Os picos dos eventos endotérmicos observados na DTA coincidem com as faixas de temperatura da degradação das amostras encontrados nas curvas de TG. As frações mais polares apresentam picos endotérmicos discretos, quando comparados aos picos do extrato etanólico e da fração de acetato de etila. Portanto, é possível deduzir que tanto a fração hexano quanto a fração clorofórmio necessitam de menos calor para começar a sua degradação.

5. CONCLUSÃO

Devido à atividade antimicrobiana satisfatória encontrada frente a bactérias envolvidas na colonização inicial da superfície dentária e da inicialização da cárie, alinhado a baixa toxicidade encontrada, todas as amostras, em especial a fração hexano do extrato etanólico da casca de *Schinopsis brasiliensis* Engl é um insumo ativo vegetal

com bastante potencial para ser utilizado em formulações odontológicas de controle do biofilme dentário.

AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem a Universidade Estadual da Paraíba e ao PROCAD/MCTI/CNPq/MEC/Capes pelo aporte financeiro. Ainda agradecem especialmente ao professor Ivan Coelho Dantas (*in memoriam*) pela indicação da planta utilizada nesse trabalho

REFERÊNCIAS

1. Pereira EMR, Gomes RT, Freire NR, Aguiar RG, Brandão MGL, Santos VR (2011). *In vitro* Antimicrobial Activity of Brazilian Medicinal Plant Extracts against Pathogenic Microorganisms of Interest to Dentistry. *Planta Med* 77(4):401-404.
2. Sponchiado EC, Pereira JV, Marques AA, Garcia LF, França SC (2014). In vitro assessment of antimicrobial activity of *Pothomorphe umbellata* extracts against *Enterococcus faecalis*. *Indian J Dent Res* 25(1):64-68.
3. Santamaria Junior M, Petermann KD, Vedovello SA, Degan V, Lucato A, Franzini CM (2014). Antimicrobial effect of *Melaleuca alternifolia* dental gel in orthodontic patients. *Am J Orthod Dentofacial Orthop* 145(2):198-202.
4. Lima RF, Alves EP, Rosalen PL, Ruiz ALTG, Duarte MCT, Góes VFF, Medeiros ACD, Pereira JV, Godoy GP, Costa EMMB (2014). Antimicrobial and antiproliferative potential of *Anadenanthera colubrina* (Vell.) Brenan. *Evid Based Complement Alternat Med*. DOI 10.1155/2014/802696
5. Saraiva AM, Saraiva CL, Cordeiro RP, Soares RR, Xavier HS, Caetano N (2013). Atividade antimicrobiana e sinérgica das frações das folhas de *Schinopsis brasiliensis* Engl. frente a clones multirresistentes de *Staphylococcus aureus*. *Rev Bras Plantas Med* 15(2):199-207.
6. Silva MSP, Brandão DO, Chaves TP, Formiga-Filho ALN, Costa EMMB, Santos VL, Medeiros ACD (2012). Study bioprospecting of medicinal plant extracts of the semiarid northeast: contribution to the control of oral microorganisms. *Evid Based Complement Alternat Med*.

7. Saraiva AM, Castro RHA, Cordeiro RP, Peixoto Sobrinho TJS, Castro VTNA, Amorim ELC, Xavier HS, Pisciotano MNC (2011). *In vitro* evaluation of antioxidante, antimicrobial and toxicity propeties of extracts of *Schinopsis brasiliensis* Engl. (Anacardiaceae). Afr J Pharm Pharmacol 5(14):1724-1731.
8. Albuquerque UP, Medeiros PM, Almeida ALS, Monteiro JM, Lins-Neto EMF, Melo JG, Santos JP (2007). Medical plants of the *caatinga* (semi-arid) vegetation of NE Brazil: a quantitative approach. J Ethnopharmacol 114:325-354.
9. Albuquerque UP (2006). Re-examining hypotheses concerning the use and knowledge of medicinal plants: a study in the Caatinga vegetation of NE Brazil. J Ethnobiol Ethnomed 2:30.
10. Almeida CFCBR, Lima e Silva TC, Amorim ELC, Maia MBS, Albuquerque UP (2005). Life strategy and chemical composition as predictors of the selection of medicinal plants from *caatinga* (Northeast Brazil). J Arid Environments 62:127-142.
11. Santos CCS, Araújo SS, Santos ALLM, Almeida ECV, Dias AS, Damascena NP, Santos DM, Santos MIS, Júnior KALR, Pereira CKB, Lima ACB, Shan AYKV, Santana AEG, Estevam CS, Araújo BS (2014). Evaluation of the toxicity and molluscicidal and larvicidal activities of *Schinopsis brasiliensis* stem bark extract and its fractions. Braz J Pharma 24:298-303.
12. Fernandes FHA, Santana CP, Santos RL, Correia LP, Conceição MM, Macedo RO, Medeiros ACD (2013). Thermal characterization of dried extract of medicinal plant by DSC and analytical techniques. J Therm Anal Calorim 113:443-447.
13. Clinical and Laboratory Standards Institute (2009). Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically. Vol 29 of CLSI document M07-28. Wayne/PA- USA.
14. Cruz-Silva MM, Madeira VMC, Almeida LM, Custódio JBA (2000). Hemolysis of human erythrocytes induced by tamoxifen is related to disruption of membrane structure. Biochim Biophys Acta 1464:41-61.
15. Cruz-Silva MM, Madeira VMC, Almeida LM, Custódio JBA (2001). Hydroxytamoxifen interaction with human erythrocytes membrane and

- induction of permeabilization and subsequent hemolysis. *Toxicology in Vitro*.15:612-615.
16. Protopopova M, Hanrahan C, Nikonenko B, Samala R, Chen P, Gearhart J, Einck L, Nancy CA (2005). Identification of a new antitubercular drug candidate, SQ 109, from a combinatorial library of 1,2 ethylenediamines. *J Antimicrob Chemother* 56:968-974
 17. Meda A, Lamien CE, Romito M, Millogo J, Nacoulma OG (2005). Determination of the total phenolic, flavonoid and proline contents in Burkina Fasan honey, as well as their radical scavenging activity. *Food Chem* 91:571-577.
 18. Makkar HPS, Becker K (1993). Vanillin-HCl method for condensed tannins: effect of organic solvents used for extraction of tannins. *J Chem Ecol* 19:613-621.
 19. Chandra S, Mejía EG (2004). Polyphenolic Compounds, Antioxidant Capacity, and Quinone Reductase Activity of an Aqueous Extract of *Ardisia compressa* in Comparison to Mate (*Ilex paraguariensis*) and Green (*Camellia sinensis*) Teas. *J Agric Food Chem* 52:3583-3589.
 20. Schieber A, Keller P, Carle R (2001). Determination of phenolic acids and flavonoids of apple and pear by high-performance liquid chromatography. *J Chromatogr A*. 265-273
 21. Castro ML, Vilela WR, Zauli RG, Ikegaki M, Rehder VLG, Foglio MA, Alencar SM, Rosalen PL (2009). Bioassay guided purification of the antimicrobial fraction of a brazilian própolis from Bahia state. *BMC Complement Altern Med* 9:25
 22. Haas AN, Pannuti CM, Andrade AKP, Escobar EC, Almeida ER, Costa FO, Cortelli JR, Cortelli SC, Rode SM, Pedrazzi V, Oppermann RV (2014). Mouthwashes for the control of supragingival biofilm and gingivitis in orthodontic patients: evidence-based recommendations for clinicians. *Braz Oral Res* 28(1):1-8.
 23. Duarte S, Gregoire S, Singh AP, Vorsa N, Schaich K, Bowen WH, Koo H (2006). Inhibitory effects of cranberry polyphenols on formation and

- acidogenicity of *Streptococcus mutans* biofilms. FEMS Microbiol Lett 257(1):50-6.
24. Bézivin C, Tomasi F, Lohézie-Le D, Boustie J (2003). Cytotoxic activity of some lichen extracts on murine and human cancer cell lines. Phytomed 10:499-503
25. Reimão JQ, Taniwak NN, Tempore AG (2010). Furazolidone is a selective in vitro candidate against *Leishmania (L.) chagasi*: an ultrastructural study. Parasitol Res 106:1465-1969
26. Moore BD, Andrew RL, Külheim C, Foley WJ (2014). Explaining intraspecific diversity in plant secondary metabolites in an ecological context. New Phytol 201(3):733-750
27. Li X, Svedin E, Mo H, Atwell S, Dilkes BP, Chapple C (2014). Exploiting Natural Variation of Secondary Metabolism Identifies a Gene Controlling the Glycosylation Diversity of Dihydroxybenzoic Acids in *Arabidopsis thaliana*. Genetics 198(3):1267-1276.
28. Gouvea DR, Gobbo-Neto L, Sakamoto HT, Lopes NP, Lopes JLC, Meloni F, Amaral JG (2012). Seasonal variation of the major secondary metabolites present in the extract of *Eremanthus mattogrossensis* Less (Asteraceae: Vernoniae) leaves. Quím Nova 35(11).

Legenda das Figuras

Figura 1: Cromatograma das amostras. a: Extrato Etanólico; b: Fração Hexano; C: Fração Clorofórmio; d: Fração Acetato de Etila.

Figura 2: Curva de TG do ácido gálico e das amostras produzidas a partir do extrato de *S. brasiliensis* Engl.

Figura 3: Curva de DTA do ácido gálico e das amostras produzidas a partir do extrato de *S. brasiliensis* Engl

Figura 1: Cromatograma das amostras. a: Extrato Etanólico; b: Fração Hexano; c: Fração Clorofórmio; d: Fração Acetato de Etila.

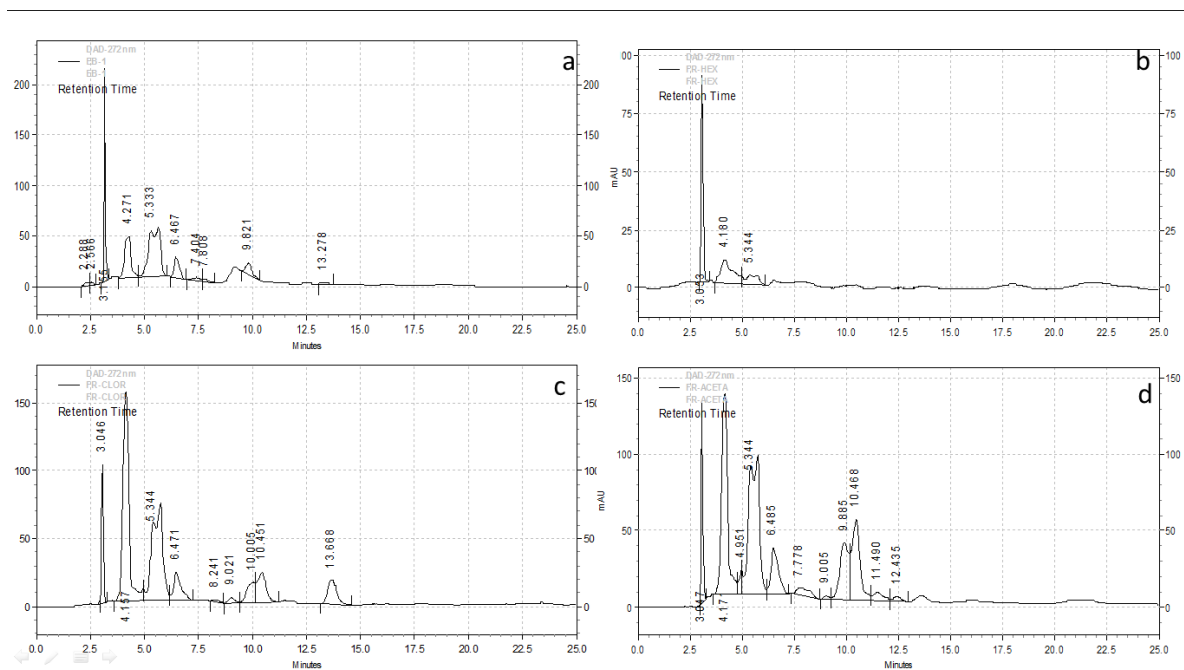


Figura 2: Curva de TG do ácido gálico e das amostras produzidas a partir do extrato de *S. brasiliensis* Engl.

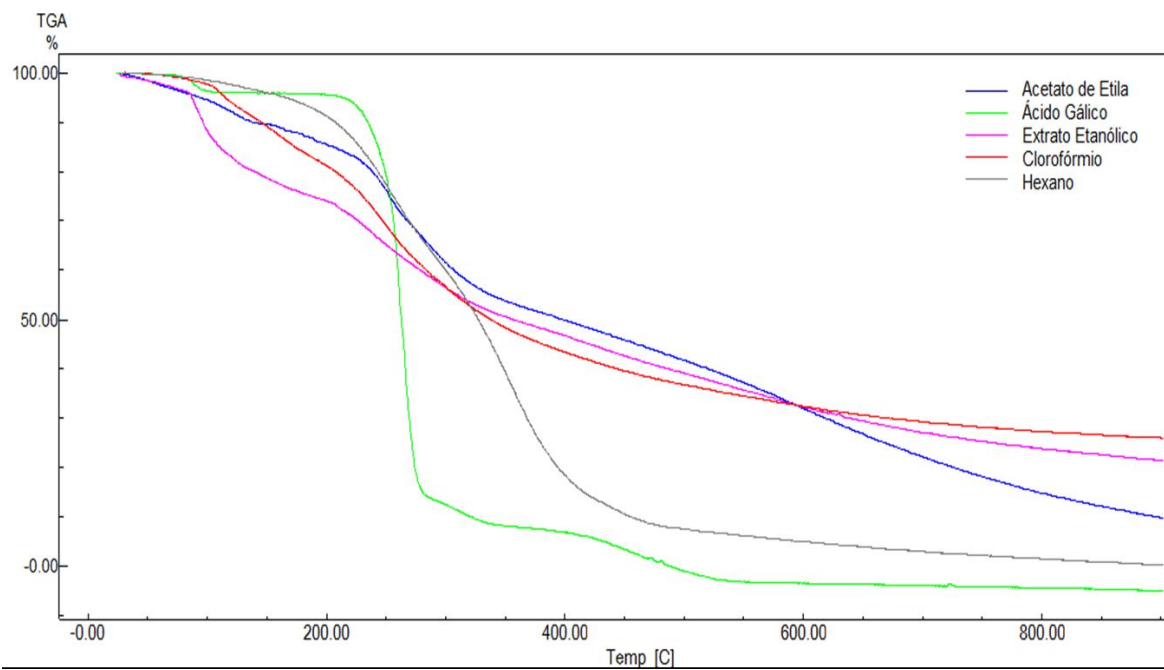
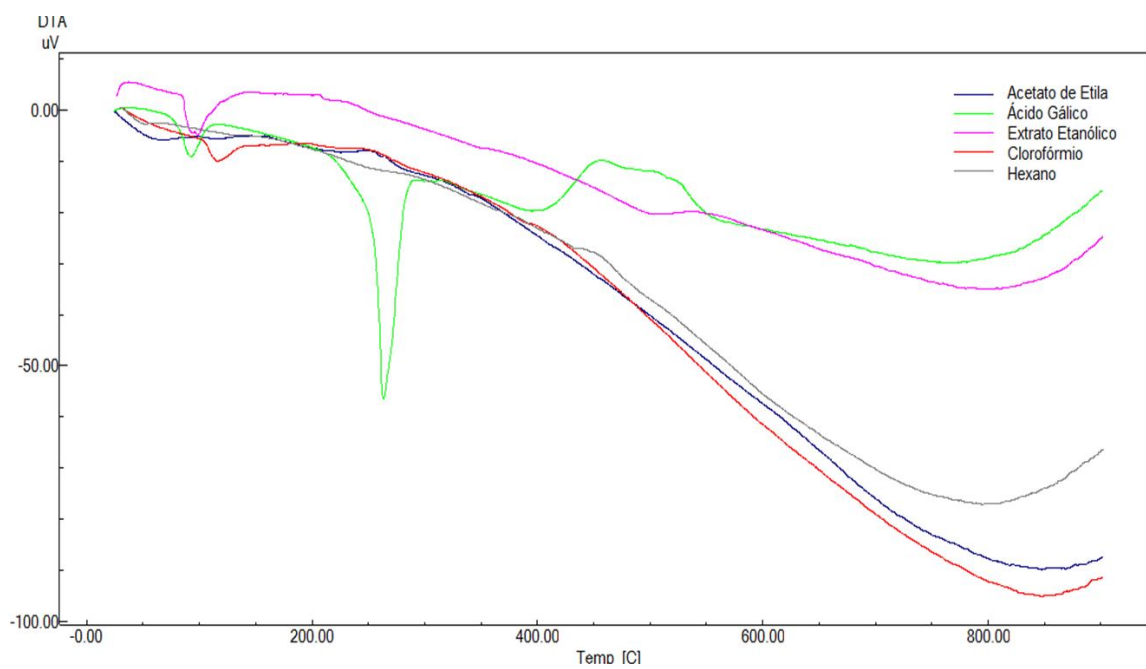


Figura 3: Curva de DTA do ácido gálico e das amostras produzidas a partir do extrato de *S. brasiliensis* Engl.



Tabelas

Tabela 1: Potencial Hemolisante, IC₅₀, Concentração Inibitória Mínima (CIM – mg/mL) e Índice de Seletividade (IS) das soluções testadas.

Solução	Potencial Hemolisante			IC ₅₀ (mg/mL)	S.mu		S.o		S.mi		S.s		S.a	
	1,0 mg/mL (%)	2,5 mg/mL (%)	5,0 mg/mL (%)		CIM	IS	CIM	IS	CIM	IS	CIM	IS	CIM	IS
Hex	0.0	9.0	13.0	15,77	0.250	63	0.500	31	0.500	31	0.500	31	0.250	63
Clo	0.0	5.0	10.0	22,04	0.500	44	1.000	22	0.250	88	0.250	88	0.250	88
AcEt	1.0	8.0	14.0	15,40	0.500	30	1.000	15	0.500	30	0.500	30	0.250	60
EE	1.0	2.0	4.0	50,27	0.500	100	0.500	100	0.500	100	0.250	201	0.250	201
CHX	*	*	*	0,38	0.150	2	0.300	1	0.060	6	0.150	2	0.060	6

Hex: Fração Hexano; Clo: Fração Clorofórmio; AcEt: Fração Acetato de Etila; EE: Extrato Etanólico; CHX: Clorexidina; S.mu:

Streptococcus Mutans; S.o: *Streptococcus oralis*; S.mi: *Streptococcus mitis*; S.s: *Streptococcus salivarius*; S.a: *Staphylococcus aureus*.

*A concentração da clorexidina para o potencial hemolisante foi determinada nas concentrações de 0,06, 0,12 e 0,20 mg/mL.

Tabela 2: Quantidade de taninos totais, flavonoides totais e polifenóis totais dos extratos de *S. brasiliensis* Engl. obtidos por espectroscopia na região visível.

Amostra	Taninos Totais ($\mu\text{g}/\text{mg}$)	Flavonoides Totais ($\mu\text{g}/\text{mg}$)	Polifenóis Totais ($\mu\text{g}/\text{mg}$)
Hex	-	8,40	75,38
Clo	-	25,71	592,01
AcEt	-	17,69	559,33
EE	15,83	6,94	598,55

Hex: Fração Hexano; Clo: Fração Clorofórmio; AcEt: Fração Acetato de Etila; EE: Extrato Etanólico .

Tabela 3: Dados da curva de TG do extrato e frações de *S. brasiliensis* Engl.

Etapas		Amostras				
		Hex	Clo	AcEt	EE	AG
1	Início-Fim (°C)	29,4-152,5	29,5-106,0	29,4 – 123,2	30,0-86,9	83,5-94,1
	Perda de Massa (%)	5,3	3,5	6,3	4,5	3,4
2	Início-Fim (°C)	214,1-266,2	108,9-134,53	123,2-188,2	87,0-202,8	251,3-272,5
	Perda de Massa (%)	31,6	13,0	9,1	21,5	80,5
3	Início-Fim (°C)	267,2-372,1	134,02-215,9	207,5-287,8	228,7-271,1	273,1-322,9
	Perda de Massa (%)	42,2	10,0	31,8	18,9	4,2
4	Início-Fim (°C)	375,4-427,2	215,19-284,3	287,8-511,6	272,0-627,9	478,3-502,5
	Perda de Massa (%)	12,0	29,2	15,8	24,4	10,1
5	Início-Fim (°C)	428,0-750,1	284,3-519,1	511,6-634,5		
	Perda de Massa (%)	8,8	18,5	37,5		

Hex: Fração Hexano; Clo: Fração Clorofórmio; AcEt: Fração Acetato de Etila; EE: Extrato Etanólico; AG: Ácido Gálico.

ARTIGO 2

Periódico: Journal of Microencapsulation

Fator de Impacto: 1,878 / Qualis Odontologia B2

Artigo formatado segundo as normas de publicação do periódico (ANEXO B)

Desenvolvimento, caracterização e atividade antimicrobiana de micropartículas produzidas a partir de extrato de *Schinopsis brasiliensis* Engl.

Pedro Henrique Sette-de-Souza^{a,d}, Fernanda P. Nóbrega^a, Cleildo P de Santana^a, Marta Cristina Teixeira Duarte^b, Mary Ann Foglio^b, Pedro Luiz Rosalen^c, Jozinete Vieira Pereira^d, Francinalva Dantas de Medeiros^a, Ana Cláudia Dantas de Medeiros^{a,d*}

^a Laboratório de Desenvolvimento e Ensaio de Medicamentos, Universidade Estadual da Paraíba. Campina Grande, Paraíba, 58429-500, Brasil. *E-mail: anaclaudia@uepb.edu.br

^b Centro Pluridisciplinar de Pesquisas Químicas, Biológicas e Agrícolas, Universidade Estadual de Campinas. Campinas, São Paulo, 13081-970, Brasil

^c Departamento de Farmacologia e Anestesiologia, Faculdade de Odontologia de Piracicaba, Universidade Estadual de Campinas. Piracicaba, São Paulo, 13414-903, Brasil.

^d Programa de Pós-Graduação em Odontologia, Universidade Estadual da Paraíba. Campina Grande, Paraíba, 58429-500, Brasil.

*Autor correspondente

Laboratório de Desenvolvimento e Ensaio de Medicamentos, Universidade Estadual da Paraíba. Rua das Baraúnas, 351, Bairro Universitário. Campina Grande-PB, Brasil – CEP: 58429-500. E-mail: anaclaudia@uepb.edu.br

Tel: + 55 83 3315 3300 (Ext. 3516)

Descritores: *Schinopsis brasiliensis* Engl., Micropartículas, Quitosana, Odontologia, *Enterococcus faecalis*.

Resumo

Contexto: O *Enterococcus faecalis* ainda é um dos principais responsáveis pelo insucesso dos tratamentos endodônticos. Com a busca por alternativas viáveis para combater microrganismos resistentes crescendo a cada dia, faz-se necessário pesquisar produtos com efeitos adversos mínimos e alta eficácia. **Objetivo:** Avaliar a atividade biológica, o perfil fitoquímico e de degradação térmica de micropartículas produzidas a partir da casca de *Schinopsis brasiliensis* Engl.. **Material e Métodos:** As micropartículas foram produzidas em um aparelho de *spray drier* com temperatura de entrada de 100°C, vazão do ar comprimido de 45L/h e vazão da bomba variando entre 0.5 a 0.3 mL/min, obtendo-se ao final três amostras distintas. A eficiência de encapsulação foi aferida através da diferença de leitura em espectrofotômetro do teor do extrato encapsulado e do teor encontrado na superfície das micropartículas. A ação antimicrobiana foi avaliada com base na concentração inibitória mínima (CIM). Já o potencial citotóxico foi analisado com base no potencial hemolisante e do índice de seletividade (IS). A caracterização fitoquímica foi feita através da quantificação de taninos, flavonoides e polifenóis. Para as curvas de termogravimetria (TG) e análise térmica diferencial (DTA) as amostras foram aquecidas em uma taxa de aquecimento de 10 °C/min, de 25 °C a 900 °C, em uma atmosfera de nitrogênio. **Resultados:** A micropartícula produzida com vazão de 0.4 mL/min apresentou a maior eficiência de encapsulação (88%) e melhor CIM (0.250/0.500 – padrão/isolado clínico) frente as outras amostras, mesmo com a menor concentração de fitocompostos, sendo seletiva mais de 40 vezes para as bactérias do que para as células humanas. Apenas o extrato hidroalcoólico apresentou flavonoides (10,16 mg). A micropartícula 4 absorve mais calor do que todas as outras amostras e por isso se degrada mais que as demais. **Conclusão:** amostras testadas provenientes da *S. brasiliensis* apresentam potencial para serem utilizadas como material prima no desenvolvimento de medicamento intracanal.

INTRODUÇÃO

A microencapsulação é um processo físico de aplicação de um polímero em um material, para protegê-lo de vários fatores (Matioli e Rodriguez-Amaya, 2003). A facilidade de incorporação de microcápsulas em formulações farmacêuticas é uma característica desejável a alguns produtos graças ao aumento da dissolução e da permeabilidade do fármaco encapsulado (Alhnan e Basit, 2011). Com o aumento da resistência microbiana e a busca de novas terapias (Pereira et al., 2011) há um crescimento no número de pesquisas com produtos naturais na odontologia, principalmente quando é incorporado a esses produtos a tecnologia farmacêutica (Li et al., 2010; Vinagre et al., 2011; Lins et al., 2013;).

Nesse sentido, a *Schinopsis brasiliensis* Engl., popularmente conhecida como braúna, quebracho ou chamacoco, é utilizada na medicina popular brasileira com fins diversificados (Almeida et al., 2005; Albuquerque, 2006; Albuquerque et al., 2007; Saraiva et al., 2011; Silva et al., 2012; Saraiva et al., 2013;). Silva et al. (2012) elucidaram o potencial antibacteriano de extratos da *S. brasiliensis* frente a *Enterococcus faecalis*, e Santos et al. (2014) verificaram a ausência de toxicidade no extrato hidroalcolico da planta. Contudo, não há estudos que utilizem a microencapsulação de extratos vegetais para o combate a infecções endodônticas persistentes.

Assim, o objetivo desse estudo foi avaliar a atividade antimicrobiana frente microrganismos orais envolvidos com a resistência a tratamento endodôntico de microcápsulas produzidas a partir do extrato hidroalcolico da casca da *Schinopsis brasiliensis*, avaliando seu potencial citotóxico e seletivo para células humanas, bem como fazer a sua caracterização fitoquímica e perfil de degradação.

MATERIAIS E MÉTODOS

Coleta do Material e Obtenção do Extrato

A casca da *Schinopsis brasiliensis* Engl. foi coletada na região do semiárido do Estado da Paraíba. A excisata foi preparada e identificada no herbário Professor Jayme Coelho de Moraes (PRU), da Universidade Federal da Paraíba com número EAN-14049.

O material vegetal foi seco a 40 °C. O extrato hidroalcolólico (EH) foi preparado através da extração assistida por banho ultrassônico por uma hora, a temperatura ambiente, em um sistema de solvente de etanol:água (70:30 v/v) e concentrado em evaporador rotativo à vácuo (40 °C, 55 RPM).

Produção de Micropartículas

As micropartículas foram produzidas a partir do EH. Primeiramente, concentrou-se a vácuo o extrato até que o teor de álcool ficasse inferior a 50%. Em seguida, solubilizou-se a quitosana, na proporção de 1:100 m/v, em uma solução aquosa de ácido acético a 1% (v/v). Misturou-se então o extrato com a solução de quitosana a 1% na proporção de 3:1 (v/v). A solução foi nebulizada em um aparelho *Spray Dryer*, com a finalidade de se produzir as micropartículas. A temperatura de entrada do ar foi de 100 °C e vazão do ar comprimido de 45L/h. O único parâmetro que teve variação foi a vazão da bomba, pois esta variação modifica o tamanho das micropartículas obtidas. Dessa maneira, as soluções sofreram três variações da vazão de fluxo, resultando na micropartícula 5 (vazão de 0,50 mL/min), micropartícula 4 (vazão de 0,40 mL/min) e micropartícula 3 (vazão de 0,30 mL/min).

Caracterização das Micropartículas

Eficiências de Encapsulação

Para avaliar a eficiência de encapsulação (EE) do processo, foram pesados 100 mg de cada amostra e lavado com 10 mL de água destilada para solubilizar o extrato que ficou no exterior da micropartícula (S), sem quebra-la, e outros 100 mg das amostras foram lavados com 10 mL de metanol para quebrar as micropartículas (T). Após essa etapa, cada amostra foi centrifugada a 2500 RPM por 10 minutos. A leitura do sobrenadante foi realizada em uma absorbância de 510 nm em espectrofotômetro (Shimadzu® UV mini – 1240). O experimento foi realizado em triplicata, sendo o re-teste realizado em dias consecutivos, totalizando nove leituras de cada amostra. A EE foi calculada segundo a equação abaixo, proposta por Barbosa et al. (2005):

$$EE = \frac{(T - S)}{T} \times 100$$

Utilizou-se o teste de Kruskal-Wallis para verificar se houve diferença estatisticamente significativa entre as absorbâncias de cada vazão. Constatada essa diferença, realizou-se o teste de Mann-Whitney com penalização de Bonferroni, para identificar entre quais grupos estava essa diferença.

Análise Térmica

As curvas de termogravimetria (TG) e análise térmica diferencial (DTA) foram realizadas utilizando um DTG-60 (Shimadzu). Amostras foram aquecidas em uma taxa de aquecimento de 10 °C/min, com uma variação de temperatura de 25 °C a 900 °C, em uma atmosfera de nitrogênio. As amostras foram acondicionadas em um cadinho de alumina, contendo aproximadamente 7,0 mg de amostra.

Concentração Inibitória Mínima

Para esse ensaio foi utilizada cepa padrão de *Enterococcus faecalis* (ATCC 29219) e um isolado clínico bucal de *E. faecalis*. Para essa etapa, as micropartículas e o extrato hidroalcoólico foram solubilizados em DMSO 10% e meio de cultura *Brain Heart Infusion* – BHI em uma concentração de 1,0 mg/mL. Cada ensaio microbiológico foi realizado em triplicata frente às linhagens bacterianas selecionadas.

A determinação da concentração inibitória mínima (CIM) foi realizada conforme preconizado pelo *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI, 2012). A suspensão microbiana foi ajustada em espectrofotômetro, no comprimento de onda de 625 nm, ao equivalente a 10^6 UFC/mL. Primeiramente, 100 μ L de cada micropartícula e do extrato hidroalcoólico foi diluído em série com caldo BHI em uma placa de 96 poços, assim como o controle positivo (Clorexidina a 0,12% - Sigma-Aldrich). Cem microlitros do inóculo com o microrganismo foi adicionado nos poços. As placas foram incubadas a $37 \pm 0,5$ °C por 24 horas e o crescimento bacteriano foi indicado pela adição de 20 μ L da solução aquosa de resazurina® (Sigma-Aldrich) a 0,01% com a posterior incubação a $37 \pm 0,5$ °C por duas horas. Bactérias viáveis reduzem o corante, mudando sua coloração azul para rosa. A CIM foi definida como a menor concentração da substância que inibiu a mudança de coloração da resazurina®.

Citotoxicidade e Índice de Seletividade

A preparação das hemácias para o teste de citotoxicidade seguiu a metodologia descrita por Cruz-Silva et al. (2000) com algumas modificações. O sangue utilizado foi doado pelo laboratório de Análises Clínicas da UEPB e acondicionado em tubo com heparina. O plasma foi retirado após centrifugação a 2500 rpm por 5 minutos. Posteriormente, a suspensão de hemácias foi lavada com solução salina 1% três vezes. As hemácias foram ressuspensas

com a mesma solução e o volume foi ajustado para 5%. Então, colocou-se 1,5 mL da suspensão de hemácia a 5% juntamente com 1,5 mL das soluções teste na concentração de 1,0, 2,5 e 5,0 mg/mL em tubos de ensaio, os quais foram deixados em repouso durante 1 hora a temperatura ambiente para que acontecesse a hemólise. Após esse período, cada tubo foi centrifugado a 2500 RPM por 10 minutos, sendo o sobrenadante retirado para leitura em espectrofotômetro (Shimadzu® UV mini – 1240) em um comprimento de onda de 540 nm (Cruz-Silva et al., 2001). O controle positivo utilizado foi a solução de Turk 1% e o negativo a solução salina 1%. A análise foi feita em triplicata. O potencial hemolisante das substâncias foi calculado, conforme equação abaixo:

$$Ph = \frac{Ae - Ab}{At} \times 100$$

Onde:

Ph = Potencial hemolisante (em porcentagem)

Ae = Absorbância da amostra testada

Ab = Branco da amostra testada

At = Absorbância do Controle Positivo

A partir dos dados obtidos do ensaio, a curva de linearidade foi plotada e através da equação da reta gerada se determinou a concentração necessária de cada extrato capaz de causar hemólise em 50% das hemácias (IC_{50}). Esses dados foram utilizados para determinar o Índice de Seletividade (IS) das amostras frente aos microrganismos testados, seguindo a metodologia proposta por Protopopova et al. (2005), através da equação abaixo:

$$IS = \frac{IC_{50}}{CIM}$$

Onde:

IS = Índice de Seletividade

IC₅₀ = Concentração das Amostras capaz de causar hemólise em 50 % das hemácias

CIM = Concentração Inibitória Mínima frente ao microrganismo teste

Screening Fitoquímico

Para a determinação do teor de polifenóis totais, foi utilizado o método descrito por Chandra e Mejía (2004), sendo adicionada solução aquosa do extrato ao reagente de Folin-Ciocalteu 1N. Após 2 minutos, adicionou-se a solução aquosa de carbonato de sódio (Na₂CO₃) a 20%, permanecendo assim por mais 10 minutos. Logo após, foi realizada a leitura da absorbância a 757 nm em espectrofotômetro (Shimadzu[®] UV mini – 1240). A curva de calibração foi obtida a partir de soluções de ácido gálico. A concentração de polifenóis foi expressa em miligramas equivalentes de ácido gálico.

Já a determinação do conteúdo de flavonoides totais seguiu o método proposto por Meda et al. (2005). Adicionou-se ao extrato uma solução de cloreto de alumínio (AlCl₃) a 2% diluído em metanol. Aguardou-se o tempo de 10 minutos e realizou-se a leitura da absorbância a 415 nm em espectrofotômetro. A curva de calibração foi obtida a partir de soluções de quercetina. A concentração de flavonoides foi expressa em miligramas equivalentes de quercetina.

Por fim, a quantificação de taninos totais foi feita através da metodologia proposta por Makkar e Becker (1993). Adicionou-se ao extrato uma solução de vanilina 4% (m/v) em metanol. Em seguida, adicionou-se 1,5 mL de HCl concentrado (37%). A leitura foi realizada com absorbância de 500 nm em espectrofotômetro. O resultado foi determinado pela interpolação da absorbância das amostras contra uma curva de calibração construída com os padrões de catequina e expresso como mg de equivalentes de catequina por g de extrato.

Todas as análises foram realizadas em triplicata.

RESULTADOS

Caracterização das Micropartículas

Eficiência de Encapsulação

A Eficiência de Encapsulação das micropartículas pode ser observada na tabela 1.

Análise Térmica

As curvas da TG e da DTA das micropartículas podem ser visualizadas na figura 1 e 2, respectivamente. Observa-se que a quitosana apresenta curva bem característica, enquanto que a micropartícula 4 apresenta perfil de degradação diferente das outras duas micropartículas. Os picos de cada evento são demonstrados na tabela 2.

Concentração Inibitória Mínima, Citotoxicidade e Índice de Seletividade

Para a cepa padrão do *Enterococcus faecalis* todos os extratos testados inibiram o seu crescimento. Porém, para o isolado clínico utilizado apenas a micropartícula 4 foi capaz de inibir o crescimento nas concentrações testadas. Apesar da micropartícula 4 possuir um IC₅₀ menor do que as outras micropartículas, ela é mais seletiva para as bactérias testadas do que as demais. Esses resultados podem ser visualizados na tabela 3.

Screening Fitoquímico

Os resultados da quantificação de fitocompostos de cada micropartícula e do extrato bruto podem ser visualizados na tabela 4.

DISCUSSÃO

A quitosana protege o extrato de *Schinopsis brasiliensis* da degradação. Os perfis de degradação das micropartículas apresentam dois picos de decomposição, os picos coincidem no ponto inicial para todas as micropartículas e diferindo no outro pico para a micropartícula 4. O primeiro pico corresponde à perda de água pelas micropartículas. O segundo, à decomposição da quitosana nas micropartículas. Os picos da quitosana coincidem com os encontrados em diversos estudos (Real et al., 2013; Ge, Wang, 2014): o primeiro pico da degradação é atribuída a perda de água absorvida pelo polímero; a segunda corresponde a desacetilação da quitosana e degradação química; por fim, o último pico pode está associada com a degradação dos resíduos carbônicos formados durante a desacetilação (Wang et al., 2005; Real et al., 2013). A micropartícula 4 se degrada mais do que as outras duas, degradando-se inclusive mais do que a quitosana. Esse fato claramente está relacionado com os parâmetros de vazão do fluxo utilizados, tendo em vista que foram as únicas alterações na produção.

Resultado semelhante foi encontrado por Rodrigues et al. (2011) ao avaliar a influência da variação de parâmetros na concentração de óleo de peixe enriquecido no éster etílico do ácido docoso-hexaenóico (DHAAE-85%). Os autores perceberam que a vazão da bomba alterava a concentração de DHAAE-85% no núcleo de sua cápsula de maneira não linear, com tendência a ser menor nas extremidades, independente da influência dos demais fatores. Logo, admite-se que quanto mais próximo da média da variação da vazão utilizada, maior será a concentração do material encapsulado. Ainda é importante ressaltar que quanto maior for a eficiência de encapsulação das micropartículas feitas com quitosana e produzidas a partir do extrato hidroalcoólico da *S. brasiliensis* maior será sua degradação térmica.

A clorexidina foi mais efetiva para impedir o crescimento bacteriano do que as amostras testadas. Diferentemente dos produtos naturais, que apresentam compostos

biológicos ativos diluídos nas amostras, a clorexidina é uma droga sintética concentrada, o que seria uma justificativa para essa superioridade. Contudo, a clorexidina foi menos seletiva para as duas bactérias testadas do que os produtos derivados da *S. brasiliensis* utilizadas no estudo. De acordo com Protopopova et al. (2005), considera-se como protótipo ideal para o desenvolvimento de novos fármacos as substâncias que apresentam o valor do índice de seletividade superior a 10, tendo em vista que o aumento no valor do numérico do IS indica que o composto é mais tóxico ao microrganismo e pouco danoso às células humanas (Reimão et al.2010). Assim, com base nos nossos resultados, todos os produtos testados apresentam potencial para serem utilizados na produção de novos medicamentos para o tratamento de infecções endodônticas. Ademais, é importante destacar que a clorexidina é indicada para tratamentos curtos devido aos seus efeitos adversos (Haas et al., 2014), sendo os produtos naturais mais indicados para tratamentos prolongados.

Essa atividade antimicrobiana dos produtos naturais testados provavelmente está relacionada com a presença de taninos, flavonoides e polifenóis presentes na casca da *Schinopsis brasiliensis*. Cabe destacar que a eficiência de encapsulação reflete no teor dos metabólitos secundários presentes em cada amostra. Após o processo de microencapsulação, nenhuma micropartícula apresentou concentração de metabólito secundário superior ao extrato hidroalcolóico. Além disso, quanto maior foi a eficiência de encapsulação, menor foi a concentração de taninos e polifenóis totais encontrados. Pode-se explicar esse achado ao levar em consideração que o extrato não encapsulado não se consegue se ligar a quitosana. Ou seja, infere-se que durante o processo de secagem por *spray dryer* do extrato hidroalcolóico com a quitosana, as moléculas que encapsuladas dos fitocompostos se ligam de maneira irreversível à quitosana, ficando incapazes de se ligarem aos reagentes aqui utilizados na quantificação. Assim, ao proceder-se a análise fitoquímica, que leva em consideração todo o material da micropartícula, seja ele encapsulado ou não, encontrou-se

mais fitocompostos nas amostras com menor eficiência de encapsulação. Ademais, sabe-se que o processo de secagem, ao eliminar o solvente, concentra os compostos da amostra. Essa pode ser a explicação para o fato da micropartícula 3 apresentar concentração de taninos superior ao extrato nebulizado.

CONCLUSÃO

Todas as amostras testadas provenientes da *Schinopsis brasiliensis* Engl. utilizadas em nosso estudo apresentam potencial para serem utilizadas como matéria prima no desenvolvimento de medicamento intracanal, principalmente a micropartícula 4 e o extrato hidroalcoólico. Para elucidar se há interação entre a quitosana e os fitocompostos da planta, faz-se necessário a utilização de modelos moleculares de análise de complexos estáveis (docking).

REFERÊNCIAS

1. Almeida CFCBR, Lima e Silva TC, Amorim ELC, Maia MBS, Albuquerque UP. Life strategy and chemical composition as predictors of the selection of medicinal plants from *caatinga* (Northeast Brazil). *J Arid Environments*. 2005;62:127-142.
2. Castro ML, Vilela WR, Zauli RG, Ikegaki M, Rehder VLG, Foglio MA, Alencar SM, Rosalen PL. Bioassay guided purification of the antimicrobial fraction of a brazilian própolis from Bahia state. *BMC Complement Altern Med*. 2009;9:25
3. Chandra S, Mejía EG. Polyphenolic Compounds, Antioxidant Capacity, and Quinone Reductase Activity of an Aqueous Extract of *Ardisia compressa* in Comparison to Mate (*Ilex paraguariensis*) and Green (*Camellia sinensis*) Teas. *J Agric Food Chem*. 2004;52:3583-3589.

4. Fernandes FHA, Santana CP, Santos RL, Correia LP, Conceição MM, Macêdo RO, Medeiros ACD. Thermal characterization of dried extract of medicinal plant by DSC and analytical techniques. *J Therm Anal Calorim.* 2013;113:443-447.
5. Ge H, Wang S. Thermal preparation of chitosan-acrylic acid superabsorbent: optimization, characterization and water solubility. *Carbohydrate Polymers.* 2014;113:296-303
6. Gouvea DR, Gobbo-Neto L, Sakamoto HT, Lopes NP, Lopes JLC, Meloni F, Amaral JG. Seasonal variation of the major secondary metabolites present in the extract of *Eremanthus mattogrossensis* Less (Asteraceae: Vernonieae) leaves. *Química Nova.* 2012;35(11)
7. Haas AN, Pannuti CM, Andrade AKP, Escobar EC, Almeida ER, Costa FO, Cortelli JR, Cortelli SC, Rode SM, Pedrazzi V, Oppermann RV. Mouthwashes for the control of supragingival biofilm and gingivitis in orthodontic patients: evidence-based recommendations for clinicians. *Braz Oral Res.* 2014;28(1):1-8
8. Li M, Wang J, Xu Z. Effect of a variety of chinese herbs and an herb-containing dentifrice on volatile sulfur compounds associated with halitosis: an in vitro analysis. *Current Therapeutic Research,* 2010;71(2):129-40.
9. Li X, Svedin E, Mo H, Atwell S, Dilkes BP, Chapple C. Exploiting Natural Variation of Secondary Metabolism Identifies a Gene Controlling the Glycosylation Diversity of Dihydroxybenzoic Acids in *Arabidopsis thaliana*. *Genetics.* 2014; 198(3):1267-1276.
10. Lima RF, Alves EP, Rosalen PL, Ruiz ALTG, Duarte MCT, Góes VFF, Medeiros ACD, Pereira JV, Godoy GP, Costa EMMB. Antimicrobial and antiproliferative potential of *Anadenanthera colubrina* (Vell.) Brenan. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine.* 2014.

11. Lins R, Vasconcelos FHP, Leite RB, Coelho-Soares RS, Barbosa DN. Avaliação Clínica de Bochechos com Extratos de Aroeira (*Schinusterebinthinifolius*) e Camomila (*Matricaria recutita* L.) Sobre a Placa Bacteriana e a Gengivite. *Revista Brasileira de Plantas Mediciniais*, 2013;15(1):112-20.
12. Lins RX, Andrade AO, Hirata Júnior R, Wilson MJ, Lewis MAO, Williams DW, Fidel RAS. Antimicrobial resistance and virulence traits of *Enterococcus faecalis* from primary endodontic infections. *Journal of Dentistry*. 2013;41:779-786.
13. Makkar HPS, Becker K. Vanillin-HCl method for condensed tannins: effect of organic solvents used for extraction of tannins. *Journal of Chemical Ecology* (1993). 19, 613-621.
14. Meda A, Lamien CE, Romito M, Millogo J, Nacoulma OG. Determination of the total phenolic, flavonoid and proline contents in Burkina Fasan honey, as well as their radical scavenging activity. *Food Chemistry*. 2005;91:571-577.
15. Moore BD, Andrew RL, Külheim C, Foley WJ. Explaining intraspecific diversity in plant secondary metabolites in an ecological context. *New Phytol*. 2014;201(3):733-750
16. Pereira EMR, Gomes RT, Freire NR, Aguiar RG, Brandão MGL, Santos VR. *In vitro* Antimicrobial Activity of Brazilian Medicinal Plant Extracts against Pathogenic Microorganisms of Interest to Dentistry. *Planta Med*. 2011;77(4):401-404
17. Real DA, Martínez MV, Frattini A, Soazo M, Luque AG, Biasoli MS, Salomon CJ, Olivieri AC, Leonardi D. Design, characterization, and *in vitro* evaluation of antifungal polymeric films. *AAPS Pharm Sci Tech*. 2013;14(1):64-73.
18. Rodrigues RAF, Rodrigues MVN, Oliveira TIV, Bueno CZ, Souza IMO, Sartoratto A, Foglio MA. Docosahexaenoic acid ethyl Esther (DHAAE) microcapsule production by spray-drying: optimization by experimental design. *Cienc Tecnol Aliment*. 2011; 31(3):589-596.

19. Santamaria Junior M, Petermann KD, Vedovello SA, Degan V, Lucato A, Franzini CM. Antimicrobial effect of *Melaleuca alternifolia* dental gel in orthodontic patients. *Am J Orthod Dentofacial Orthop.* 2014;145(2):198-202
20. Santos CCS, Araújo SS, Santos ALLM, Almeida ECV, Dias AS, Damascena NP, Santos DM, Santos MIS, Júnior KALR, Pereira CKB, Lima ACB, Shan AYKV, Santana AEG, Estevam CS, Araújo BS. Evaluation of the toxicity and molluscicidal and larvicidal activities of *Schinopsis brasiliensis* stem bark extract and its fractions. *Braz J Pharma.* 2014;24:298-303.
21. Saraiva AM, Castro RHA, Cordeiro RP, Peixoto Sobrinho TJS, Castro VTNA, Amorim ELC, Xavier HS, Pisciotano MNC. *In vitro* evaluation of antioxidante, antimicrobial and toxicity propeties of extracts of *Schinopsis brasiliensis* Engl. (Anacardiaceae). *Afr J Pharm Pharmacol.* 2011;5(14):1724-1731.
22. Saraiva AM, Saraiva CL, Cordeiro RP, Soares RR, Xavier HS, Caetano N. Atividade antimicrobiana e sinérgica das frações das folhas de *Schinopsis brasiliensis* Engl. frente a clones multirresistentes de *Staphylococcus aureus*. *Rev Bras Plantas Med.* 2013;15(2):199-207
23. Seneviratne CJ, Yip JWY, Chang JWW, Zhang CF, Samaranayake LP. Effect of culture media and nutrients on biofilm growth kinetics of laboratory and clinical strains of *Enterococcus faecalis*. *Arch Oral Biol.* 2013;58:1327-1334.
24. Silva MSP, Brandão DO, Chaves TP, Formiga-Filho ALN, Costa EMMB, Santos VL, Medeiros ACD. Study bioprospecting of medicinal plant extracts of the semiarid northeast: contribution to the control of oral microorganisms. *Evid Based Complement Alternat Med.* 2012;2012:681207.

25. Sponchiado EC, Pereira JV, Marques AA, Garcia LF, França SC. In vitro assessment of antimicrobial activity of *Pothomorphe umbellata* extracts against *Enterococcus faecalis*. Indian J Dent Res. 2014;25(1):64-68.
26. Vinagre NPL, Farias CG, Araújo RJG, Vieira JMS, Silva Júnior JOC, Corrêa AM. Efetividade Clínica de um Enxaguatório Bucal Fitoterápico com Tintura Padronizada de *Calendula officinalis* na Manutenção da Saúde Periodontal. Revista de Odontologia da UNESP, 2011;40(1):30-5.
27. Wang SF, Shen L, Tong YJ, Chen L, Phang LY, Lim PQ. Biopolymer chitosan/montmorillonite nanocomposites: preparation and characterization. Polym Degrad Stab. 2005;90:123-131.
28. Barbosa MIMJ, Borsarelli CD, Mercadante AZ. Light stability of spray-dried bixin encapsulated with different edible polysaccharide preparations. Food Res. Int. 200;38:989–994.
29. Cruz-Silva MM, Madeira VMC, Almeida LM, Custódio JBA. Hemolysis of human erythrocytes induced by tamoxifen is related to disruption of membrane structure. Biochimica et Biophysica Acta. 2000;1464:41-61.
30. Cruz-Silva MM, Madeira VMC, Almeida LM, Custódio JBA. Hydroxytamoxifen interaction with human erythrocytes membrane and induction of permeabilization and subsequent hemolysis. Toxicology in Vitro. 2001;15:612-615.

TABELAS

Tabela 1: Eficiência de Encapsulação (EE), quartil 25, mediana e quartil 75 das amostras, conforme vazão utilizada.

	EE (%)	Q ₂₅	Mediana	Q ₇₅
$\mu 5^a$	85,02	0,142	0,153	0,163
$\mu 4^b$	88,04	0,179	0,187	0,191
$\mu 3^c$	71,68	0,099	0,111	0,122

$\mu 5$: Micropartícula 5; $\mu 4$: Micropartícula 4; $\mu 3$: Micropartícula 3. Letras iguais indicam que não houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos ($p < 0,05$).

Tabela 2: Dados da curva de TG do extrato nebulizado e das micropartículas de *S. brasiliensis* Engl.

Etapas	Amostras					
	$\mu 3$	$\mu 4$	$\mu 5$	Quitosana	EH	
1	Início-Fim (°C)	29,8-96,3	27,8-72,71	32,7-79,7	25,3-103,8	29,0-102,6
	Perda de Massa (%)	5,4	3,9	2,7	12,9	2,5
2	Início-Fim (°C)	126,5-177,8	120,0-203,4	103,1-143,1	233,6-332,5	102,8-220,1
	Perda de Massa (%)	5,8	8,7	2,6	36,4	13,7
3	Início-Fim (°C)	218,4-323,5	205,9-316,7	143,1-218,1	334,5-896,7	221,0-351,2
	Perda de Massa (%)	26,3	29,0	9,5	45,0	22,0
4	Início-Fim (°C)	328,0-650,0	323,0-898,3	220,2-329,0		349,1-561,8
	Perda de Massa (%)	28,5	55,0	28,4		22,49
5	Início-Fim (°C)	650,0-892,2		330,68-892,4		563,4-896,8
	Perda de Massa (%)	11,2		32,6		40,3

$\mu 5$: Micropartícula 5; $\mu 4$: Micropartícula 4; $\mu 3$: Micropartícula 3; EH: Extrato Nebulizado

Tabela 3: Potencial hemolisante, Concentração Inibitória Mínima (CIM – mg/mL) e Índice de Seletividade das soluções testadas.

Amostra	Potencial Hemolisante (%)			IC ₅₀ (mg/mL)	<i>E. faecalis</i> ATCC		<i>E. faecalis</i> (MB 146)	
	1.0 mg/mL	2.5 mg/mL	5.0 mg/mL		CIM	IS	CIM	IS
μ5	2.0	6.0	10.0	27.87	0.500	55	>1.000	<27
μ4	3.0	8.0	12.0	22.21	0.250	88	0.500	44
μ3	1.0	4.0	7.0	31.75	0.500	62	>1.000	<31
EHN	5.0	6.0	7.0	92.66	0.500	185	>1.000	<92
CHX	*	*	*	0.38	0.060	6	0.120	3

μ5: Micropartícula 5; μ4: Micropartícula 4; μ3: Micropartícula 3; EH: Extrato Nebulizado; CHX: Clorexidina.

*A concentração da clorexidina para o potencial hemolisante foi determinada nas concentrações de 0,06, 0,12 e 0,20 mg/mL.

Tabela 4: Quantificação de taninos, flavonoides e polifenóis totais expressos de acordo com o correspondente de cada padrão, em mg/g

	Taninos (mg/g)	Flavonoides (mg/g)	Polifenóis Totais (mg/g)
μ5	23,39	-	469,79
μ4	9,94	-	416,63
μ3	37,28	-	585,91
EH	27,12	10,16	586,13

μ5: Micropartícula 5; μ4: Micropartícula 4; μ3: Micropartícula 3; EH: Extrato Nebulizado

FIGURAS

Figura 1. Curva de TG do extrato nebulizado e das micropartículas produzidas a partir do extrato da *Schinopsis brasiliensis* Engl.

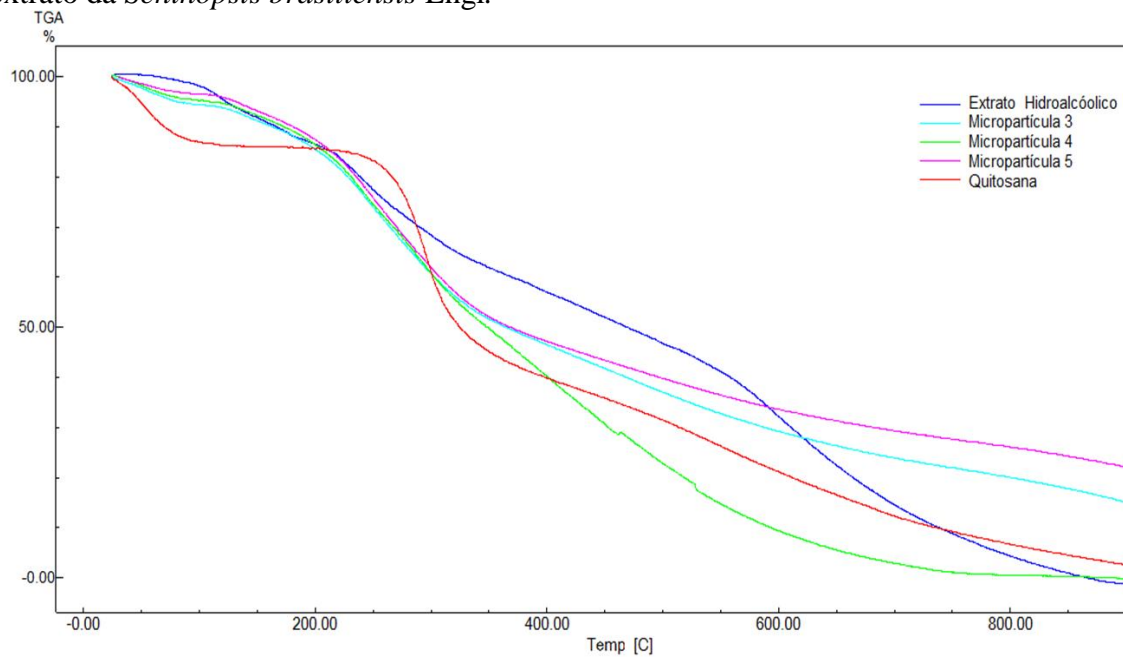
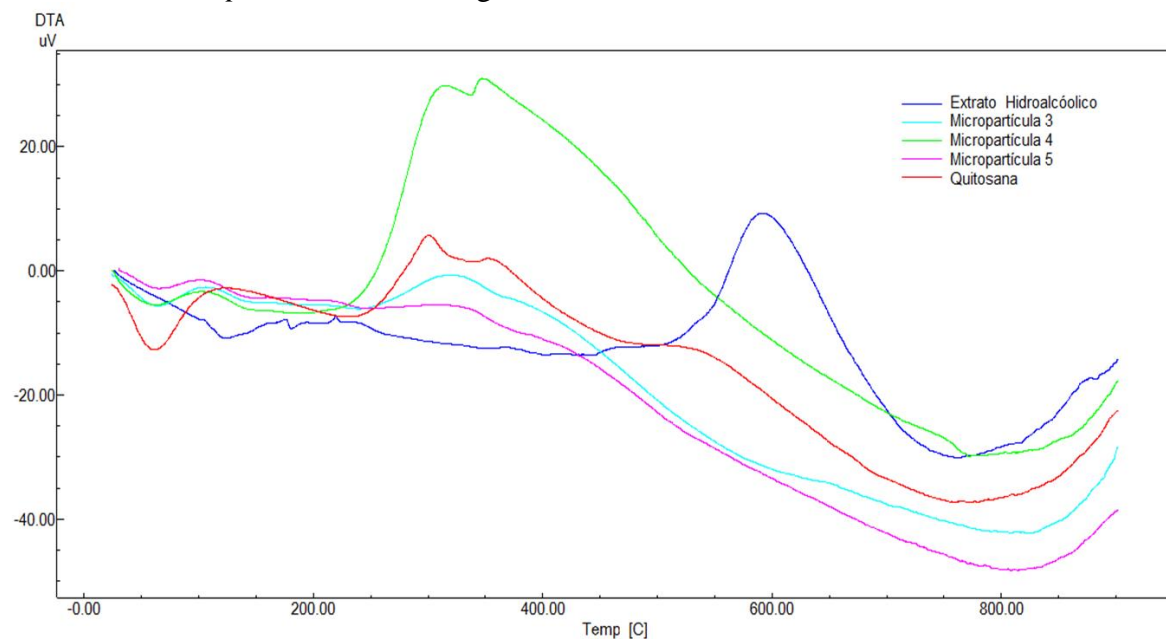


Figura 2: Curva de DTA do extrato nebulizado e das micropartículas produzidas a partir do extrato da *Schinopsis brasiliensis* Engl.



ARTIGO 3

Periódico: Journal of Endodontics

Fator de Impacto: 2,788 / Qualis Odontologia A1

Artigo formatado segundo as normas de publicação do periódico (ANEXO C)

Caracterização e fracionamento de extrato da *Schinopsis brasiliensis* Engl. bioguiado pela atividade antimicrobiana frente à *Enterococcus faecalis*

Pedro Henrique Sette-de-Souza^a, Alinne Sousa Barbosa^b, Marta Cristina Teixeira Duarte^c, Núbia de Cássia Almeida Queiroz^c, Ilza Maria Oliveira Soares^c, Mary Ann Foglio^c, Francinalva Dantas de Medeiros^b, Ana Cláudia Dantas de Medeiros^{b, 1}

^a *Departamento de Odontologia, Universidade Estadual da Paraíba, Campina Grande, Brasil*

^b *Departamento de Ciências Farmacêuticas, Universidade Estadual da Paraíba, Campina Grande, Brasil*

^c *Centro Pluridisciplinar de Pesquisas Químicas, Biológicas e Agrícolas, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, Brasil*

^d *Departamento de Farmacologia e Anestesiologia, Faculdade de Odontologia de Piracicaba, Universidade Estadual de Campinas, Piracicaba, Brasil.*

¹ Autor correspondente
E-mail: anaclaudia@uepb.edu.br
Telefone: +55 83 9332 3717

Resumo

Introdução: *Enterococcus faecalis* é o principal microrganismo relacionado ao insucesso do tratamento endodôntico, devido a sua resistência frente a determinados agentes antibacterianos. Por esse motivo, diversas pesquisas vem sendo realizadas para se encontrar um agente antimicrobiano mais eficiente contra essa bactéria. Em estudos prévios, a *Schinopsis brasiliensis* Engl. apresentou forte potencial para ser utilizado como alternativa no tratamento endodôntico. Assim, o objetivo do estudo foi avaliar a atividade antimicrobiana de frações e subfrações do extrato etanólico de *S. brasiliensis* frente à *Enterococcus faecalis* e determinar seus compostos químicos por cromatografia gasosa. **Métodos:** O extrato etanólico foi obtido por maceração com etanol 96%, por cinco dias e concentrado em evaporador rotativo à vácuo. Em seguida, procedeu-se a partição líquido-líquido com hexano, clorofórmio e acetato de etila. A concentração inibitória mínima (CIM) das frações foi estabelecida por meio da técnica de microdiluição e realizada a bioautografia e Cromatografia em Coluna com o extrato que obteve a melhor CIM. **Resultados:** A fração que apresentou melhor atividade antimicrobiana foi a fração hexano (CIM = 0,125 mg/mL), posteriormente utilizada para realização da Cromatografia em Coluna e bioautografia, resultando em 12 novas subfrações. A fração G e a fração H apresentaram CIM igual ou inferior à da fração hexano, 0,063 e 0,125 mg/mL, respectivamente. A caracterização do melhor extrato foi feito por cromatografia gasosa (CG). A GC revelou a presença de terpenos e esteróis na fração hexano. **Conclusão:** A fração hexano do extrato etanólico apresentou potencial para ser utilizada em formulações farmacêuticas que visem o combate a infecção por *E. faecalis*.

Palavras-Chave: *Enterococcus faecalis*; Cromatografia Gasosa; Detecção de massa; Produtos Naturais.

INTRODUÇÃO

Há evidências que embasam a associação de *enterococci*, em especial o *Enterococcus faecalis* com infecções endodônticas, seja ela primária ou secundária. Em até 90% dos casos em que o retratamento endodôntico é necessário, o *Enterococcus faecalis* está presente. *E. faecalis* é uma bactéria gram-positiva, considerada a espécie mais significativa no grupo em termos de resistência a antibióticos (1,2). Ademais, possui inúmeros fatores de virulência,

incluindo atividade de gelatinases, produção de bacteriocinas, formação e desenvolvimento de biofilme (2).

Nesse contexto de tratamento e retratamento, a busca por produtos naturais com atividade antibacteriana é importante devido à resistência a antibióticos apresentado pelo *Enterococcus faecalis*. Lins et al. (2) encontraram uma prevalência de 70% na resistência a tetraciclina em isolados endodônticos, tendo essa prevalência aumentando com o passar dos anos. Dessa maneira, Silva et al. (3) demonstraram atividade antibacteriana da *Schinopsis brasiliensis* Engl. frente a cepas de *Enterococcus faecalis*.

A *Schinopsis brasiliensis*, popularmente conhecida como braúna, quebracho ou chamacoco, tem suas partes utilizadas na medicina popular para diversos agravos (3-6). Além disso, Santos et al. (7) detectaram a ausência de toxicidade no mesmo extrato.

Assim, o objetivo desse estudo foi avaliar a atividade antimicrobiana frente à *Enterococcus faecalis* do extrato etanólico de *Schinopsis brasiliensis* Engl., suas frações e subfrações, bem como fazer a caracterização por cromatografia gasosa.

MATERIAIS E MÉTODOS

Preparo do Extrato

A casca da *Schinopsis brasiliensis* Engl. foi coletada na região do semiárido do Estado da Paraíba. A exsicata foi preparada e identificada no herbário Professor Jayme Coelho de Moraes (PRU), da Universidade Federal da Paraíba com número EAN-14049.

O material vegetal foi seco a 40 °C. O extrato etanólico (EB) foi obtido por percolação do pó da casca em um sistema de solvente etanol:água (96:4 v/v) por cinco dias, em três ciclos, e concentrado em evaporador rotativo à vácuo (40 °C, 55 RPM) até total remoção do solvente.

Fracionamento do extrato bruto

O EB foi submetido ao fracionamento líquido-líquido. Para isso, solubilizou-se o EB em um sistema de solvente etanol:água (80:20, v/v), na proporção 1:1 (m/v). A solução foi colocada em um funil separador e os solventes (Hexano, Clorofórmio e Acetato de Etila) foram adicionados sequencialmente na proporção 1:1 (v/v) e agitados. O funil foi deixado em repouso por aproximadamente 10 minutos, para que houvesse a separação das fases. O processo foi repetido três vezes para cada solvente, para obtenção da quantidade adequada de

cada fração. Em seguida, cada fração foi concentrada em evaporador rotativo a vácuo (40 °C, 55 RPM).

Atividade Antimicrobiana

Para essa etapa foi utilizada cepa padrão *American Type Culture Collection* (ATCC) de *Enterococcus faecalis* (29219), além de um isolado clínico bucal de *Enterococcus* (MB 146). Para essa etapa, as amostras foram solubilizadas em DMSO 10% e meio de cultura *Brain Heart Infusion* – BHI em uma concentração de 4,0 mg/mL. Cada ensaio microbiológico foi realizado em triplicata frente às linhagens bacterianas selecionadas.

A determinação da concentração inibitória mínima (CIM) foi realizada conforme preconizado pelo *Clinical and Laboratory Standards Institute* (8). O inóculo foi padronizado em tubos contendo 5 mL de solução salina a 0,9% estéril. A suspensão microbiana foi ajustada em espectrofotômetro, no comprimento de onda de 625 nm, ao equivalente a 10^6 UFC/mL. Primeiramente, 100 µL do extrato ou de cada fração na concentração de 4,0 mg/mL foi diluído em série com 100 µL de caldo BHI em uma placa de 96 poços, assim como o controle positivo (Clorexidina a 0,12% - Sigma-Aldrich). Cem microlitros do inóculo com o microrganismo foi adicionado nos poços. As placas foram incubadas a 37 °C, por 24 horas, e o crescimento bacteriano foi indicado pela adição de 20 µL da solução aquosa de resazurina (Sigma-Aldrich) a 0,01%, com a posterior incubação a $37 \pm 0,1$ °C por duas horas. Bactérias viáveis reduzem o corante, mudando sua coloração para azul. A CIM foi definida como a menor concentração da substância que inibiu a mudança de coloração da resazurina.

Após a realização da CIM, selecionou-se a bactéria isolada do ambiente bucal, devido a maior resistência apresentada frente às amostras testadas, para determinação da atividade antimicrobiana dos extratos pelo método de bioautografia. De acordo com Slusarenko et al., (9), as análises foram realizadas em placas de cromatografia em camada delgada (CCD) eluídas em um sistema de solvente de Diclorometano:Metanol (98,5:1,5 – v/v). Após dissolução das amostras em acetato de etila, aplicou-se 3 µL das amostras na concentração de 20 mg/mL nas placas de CCD, em triplicata. Uma das placas foi revelada com anisaldeído e as outras duas foram submetidas aos ensaios de bioautografia. O inóculo de *E. faecalis* (MB 146) foi padronizado segundo método da CLSI para concentração inicial de 10^8 UFC/mL. A suspensão de microrganismos foi inoculado pela técnica de “*pour plate*” no meio ágar nutriente, utilizando-se a proporção de 1:1000 (v/v). Uma alíquota de 0,5 mL de solução de cloreto de trifetil tetrazolium na concentração de 1,0 mg/mL foi adicionada ao meio

inoculado, como indicador da atividade respiratória das células. Em seguida, o meio foi vertido em placas de Petri contendo as placas de CCD, as quais foram aplicadas as amostras previamente. Após homogeneização, o material foi incubado a $37 \pm 0,1$ °C durante 24 horas. A mudança de coloração do meio para vermelho indicou crescimento bacteriano. Do mesmo modo, a formação de halos de inibição permitiu identificar a localização dos compostos bioativos frente à cepa testada. Como o teste é qualitativo, não é necessário mensurar o tamanho do halo de inibição.

Cromatografia em Coluna Seca

A fração hexânica foi pré-purificada por cromatografia em coluna seca com silicagel 60 (Merck 7734) com clorofórmio/metanol 5%, resultando em diferentes subfrações. As amostras foram agrupadas de acordo com o perfil da Cromatografia em Camada Delgada (CCD).

Análise por Cromatografia Gasosa (GC)/ Espectrometria de Massa

A análise de Cromatografia Gasosa/Espectrometria de Massa (GC/MS) foi realizada em um sistema HP-5890/5970 equipado com um J&W Scientific CPSIL 24 CB e uma coluna de capilar (30 m x 0,25 mm x 0,25m). Programa de temperatura: 150 °C (2 min); (5 °C/min); 240 °C; (10 °C/min); 300 °C (34min). Temperatura do injetor: 280 °C; temperatura do detector: 300 °C. O gás de arraste foi o Hélio (0,7 bar, 1 mL/min). A Espectrometria de Massa foi realizada a 70 eV. A velocidade de leitura foi de 0,84 leituras por segundo, de 40 a 550 unidades de massa atômica. Foi injetado 1 mL de cada amostra.

RESULTADOS

Atividade Antimicrobiana

Para todas as amostras analisadas, a concentração para inibir o crescimento da cepa clínica (MB 146) foi maior ou igual do que o necessário para inibir a cepa padrão ATCC (tabela 1).

Somente a fração hexano e o extrato etanólico apresentaram halo de inibição no ensaio de bioautografia. O halo de inibição encontrado no EB é bastante discreto e está contido na mesma região do halo de inibição da fração hexano, que teve um halo superior, estendendo-se para origem da CCD.

Cromatografia em Coluna

O método empregado resultou em 41 amostras. Após verificação de similaridade pela CCD e agrupamento, obteve-se 12 subfrações. O rendimento total do processo foi de 81,6% (407,9 mg)

Cromatografia Gasosa

A análise da cromatografia gasosa da fração hexano pode ser visualizada na figura 1.

A tabela 2 mostra a estrutura química, tempo de retenção e percentual de confiabilidade da identificação dos compostos identificados na GC.

DISCUSSÃO

O extrato etanólico da casca da *S. brasiliensis* conseguiu inibir o crescimento da cepa padrão de *E. faecalis*, corroborando os resultados encontrados por Silva et al., (3). Como esperado, a cepa padrão teve resistência aos extratos e ao antibiótico testado menor do que a bactéria proveniente do meio bucal. Isso pode ser explicado pelo fato de que a linhagem padrão utilizada não está em contato constante com agentes antibióticos, assim, ela não desenvolve resistência como a cepa isolada de um sítio bucal.

A fração hexano foi capaz de inibir o crescimento das bactérias de maneira mais eficaz do que as demais amostras testadas, com exceção da clorexidina, provavelmente devido ao fato do extrato apresentar uma grande variedade de compostos, diferentemente da droga sintética utilizada como controle positivo (10). A clorexidina 2% vem sendo proposta, na forma de gel, para utilização como medicamento intracanal, tendo em vista sua ação antibacteriana superior contra *E. faecalis* quando comparado ao tratamento convencional com Hidróxido de Cálcio (11). Contudo, cabe ressaltar que Haas et al. (12), em recente revisão sistemática, indicaram os agentes a base de produtos naturais para o tratamentos a médio/longo prazo de doenças bucais, tendo em vista os efeitos adversos provenientes da utilização prolongada de clorexidina.

Na bioautografia, o halo encontrado no extrato etanólico indica que os compostos responsáveis pela atividade antimicrobiana da *S. brasiliensis* frente a *E. faecalis* tendem a ser mais apolares, uma vez que o halo do EB coincide com o halo encontrado na fração hexano. A subfração G, bem como a H e a M, que apresentaram perfil cromatográfico compatível

com a região de inibição da fração hexano no teste de bioautografia, apresentaram CIM menor ou igual, respectivamente, à fração da qual se originaram, confirmando os resultados anteriormente encontrados. O fato do extrato etanólico ter apresentado um discreto halo de inibição da bioautografia e ter uma CIM maior do que 1,0 mg/mL significa que o composto presente nessa amostra precisa ser concentrado para aumentar a atividade antimicrobiana, o que acontece quando se faz a partição líquido-líquido.

O rendimento da Cromatografia em Coluna superior a 80,0% indica que quase a totalidade dos compostos do extrato foram retirados, ficando apenas os compostos mais polares na amostra que, através da análise de bioautografia, não apresentaram atividade antimicrobiana contra o *E. faecalis*.

A forte atividade antimicrobiana apresentada pela fração hexano pode está relacionada com a presença do β -Sitosterol, um esteroide apolar que possivelmente apresenta um alto potencial antimicrobiano e antiproliferativo (13,14). Yousefbeyk et al., 2014; Al-Oqail et al., 2012). Tamokou et al., (15) relataram a atividade antimicrobiana de um sitosterol e de uma mistura de esteróis, incluindo o β -Sitosterol, sobre *Enterococcus faecalis*. Portanto, possivelmente, a atividade antimicrobiana da fração hexano do extrato etanólico da casca de *S. brasiliensis* está relacionada com a presença desse esteroide. O mesmo estudo aponta que a concentração da mistura de esteróis necessária para impedir o crescimento do *E. faecalis* é menor do que as frações testadas e de outros compostos, corroborando também com os nossos resultados, tendo em vista que a atividade antimicrobiana do nosso extrato aumenta a medida em que se separa os compostos.

CONCLUSÃO

A fração hexano, principalmente as subfrações G e H, demonstraram potencial para o desenvolvimento de um medicamento intracanal para minimizar a incidência de falha nos tratamentos endodônticos, tendo em vista que o processo de produção dos extratos é economicamente vantajoso (quando comparado ao binômio custo-benefício), tendo em vista as baixas concentrações necessárias para inibir o crescimento do microrganismo, quando comparado com o extrato etanólico.

AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem a Universidade Estadual da Paraíba e ao PROCAD/MCTI/CNPq/MEC/Capes pelo aporte financeiro. Ainda agradecem especialmente ao professor Ivan Coelho Dantas (*in memoriam*) pela indicação da planta utilizada nesse trabalho

REFERÊNCIAS

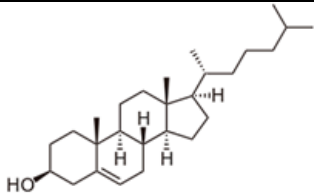
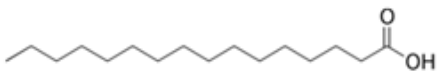
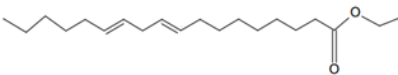
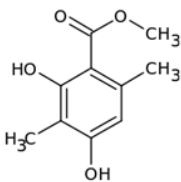
1. Seneviratne CJ, Yip JWY, Chang JWW, Zhang CF, Samaranayake LP. Effect of culture media and nutrients on biofilm growth kinetics of laboratory and clinical strains of *Enterococcus faecalis*. Arch Oral Biol. 2013;58:1327-1334.
2. Lins RX, Andrade AO, Hirata Júnior R, Wilson MJ, Lewis MAO, Williams DW, Fidel RAS. Antimicrobial resistance and virulence traits of *Enterococcus faecalis* from primary endodontic infections. Journal of Dentistry. 2013;41:779-786.
3. Silva MSP, Brandão DO, Chaves TP, Formiga-Filho ALN, Costa EMMB, Santos VL, Medeiros ACD. Study bioprospecting of medicinal plant extracts of the semiarid northeast: contribution to the control of oral microorganisms. Evid Based Complement Alternat Med. 2012;2012:681207.
4. Saraiva AM, Castro RHA, Cordeiro RP, Peixoto Sobrinho TJS, Castro VTNA, Amorim ELC, Xavier HS, Pisciotano MNC. *In vitro* evaluation of antioxidante, antimicrobial and toxicity propeties of extracts of *Schinopsis brasiliensis* Engl. (Anacardiaceae). Afr J Pharm Pharmacol. 2011;5(14):1724-1731.
5. Saraiva AM, Saraiva CL, Cordeiro RP, Soares RR, Xavier HS, Caetano N. Atividade antimicrobiana e sinérgica das frações das folhas de *Schinopsis brasiliensis* Engl. frente a clones multirresistentes de *Staphylococcus aureus*. Rev Bras Plantas Med. 2013;15(2):199-207
6. Almeida CFCBR, Lima e Silva TC, Amorim ELC, Maia MBS, Albuquerque UP. Life strategy and chemical composition as predictors of the selection of medicinal plants from *caatinga* (Northeast Brazil). J Arid Environments. 2005;62:127-142.
7. Santos CCS, Araújo SS, Santos ALLM, Almeida ECV, Dias AS, Damascena NP, Santos DM, Santos MIS, Júnior KALR, Pereira CKB, Lima ACB, Shan AYKV, Santana AEG, Estevam CS, Araújo BS. Evaluation of the toxicity and molluscicidal and larvicidal activities of *Schinopsis brasiliensis* stem bark extract and its fractions. Braz J Pharma. 2014;24:298-303
8. CLSI – Clinical and Laboratory Standards Institute. Reference Dilution Antimicrobial Susceptibility tests for bacteria that grow aerobically; Approved Standard. Vol 29 of CLSI document M07-A8, Wayne, PA, USA. 8th edition, 2009.
9. Slusarenko AJ, Longland AC, Whitehead IM. Convenient, sensitive and rapid assay for antibacterial activity of phytoalexins. Botanica Helvetica. 1989;99(2):203-207.
10. Castro ML, Vilela WR, Zauli RG, Ikegaki M, Rehder VLG, Foglio MA, Alencar SM, Rosalen PL. Bioassay guided purification of the antimicrobial fraction of a brazilian própolis from Bahia state. BMC Complement Altern Med. 2009;9:25
11. Ercan E, Dalli M, Dülgergil CT. In vitro assessment of the effectiveness of chlorhexidine gel and calcium hydroxide paste with chlorhexidine against *Enterococcus faecalis* and *Candida albicans*. Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod. 2006;102(2):27-31.

12. Haas AN, Pannuti CM, Andrade AKP, Escobar EC, Almeida ER, Costa FO, Cortelli JR, Cortelli SC, Rode SM, Pedrazzi V, Oppermann RV. Mouthwashes for the control of supragingival biofilm and gingivitis in orthodontic patients: evidence-based recommendations for clinicians. *Braz Oral Res.* 2014;28(1):1-8
13. Yousefbeyk F, Gohari AR, Hashemighahderijani Z, Ostad SN, Sourmaghi MHS, Amini M, Golfakhrabadi F, Jamalifar H, Amin G. Bioactive terpenoids and flavonoids from *Daucus littoralis* Smith subsp. *Hyrceanicus* Rech.f, an endemic species of Iran. *DARU J Pharmaceutics Sci.* 2014;22-12.
14. Al-Oqail M, Hassan WHB, Ahmad MS, Al-Rehaily AJ. Phytochemical and biological studies of *Solanum schimperianum* Hochst. *Saudi Pharmaceutical Journal.* 2012;20:371-379
15. Tamokou JDD, Kuate JR, Tene M, Nwemeguela TJK, Tane P. The antimicrobial activities of extracts and compounds isolated from *Brillantaisia lamium*. *Iran J Med Sci.* 2011;36(1):24-31

Tabela 1: Concentração Inibitória Mínima, em mg/mL, das soluções testadas frente às bactérias testas.

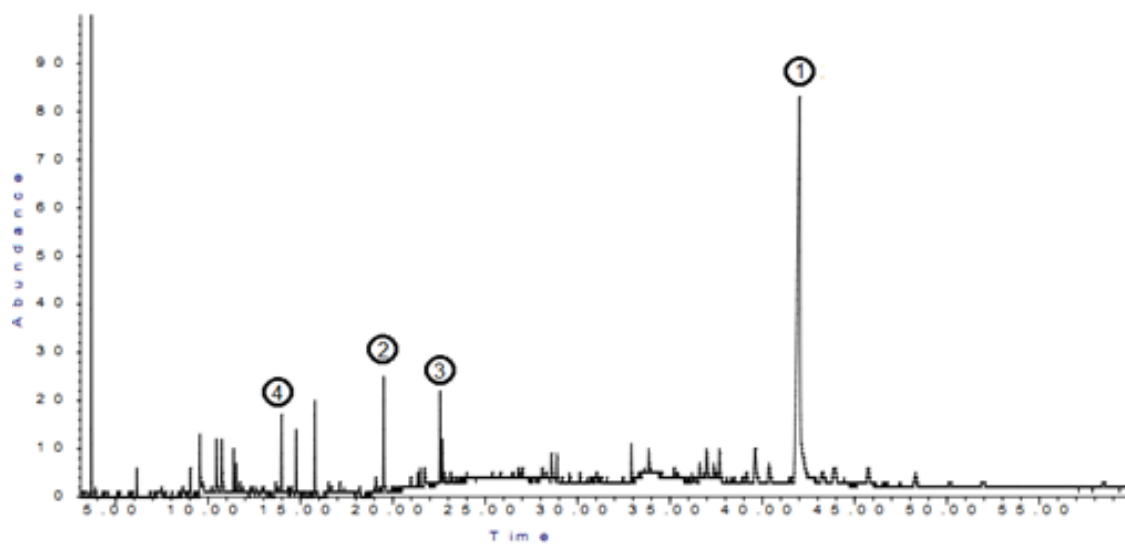
	<i>E. faecalis</i> (ATCC)	<i>E. faecalis</i> (MB 146)
Hexano	0,125	0,250
Acetato de Etila	0,500	>1,000
Clorofórmio	0,250	>1,000
Extrato Etanólico	0,250	>1,000
Subfração A	1,000	1,000
Subfração B	1,000	1,000
Subfração C	1,000	0,500
Subfração D	>1,000	>1,000
Subfração E	0,500	1,000
Subfração F	0,500	>1,000
Subfração G	0,063	0,125
Subfração H	0,125	0,250
Subfração I	0,500	>1,000
Subfração J	0,250	0,500
Subfração L	0,500	0,500
Subfração M	0,125	0,250
Clorexidina	0,006	0,012

Tabela 2: Estrutura química, tempo de retenção e percentual de confiabilidade da identificação dos compostos da fração hexano da *S. brasiliensis*, identificados no GC.

Nome do Composto	Estrutura Química	^a TR _{min}	^b Wiley Registry
β-Sitosterol		42,012	99
Ácido Hexadecanóico		19,505	98
Ácido Linoleico etil-ester		22,569	99
Ácido Atrarico		13,973	99

^a Tempo de retenção em minutos. ^b Conforme biblioteca padrão.

Figura 1: GC da fração hexano do extrato etanólico da casca da *S. brasiliensis*.



1: β -Sitosterol; 2: Ácido Hexadecanóico; 3: Ácido Linoleico etil-éster; 4: Ácido Atrarico

5. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Em todas as amostras testadas, há uma predominância de polifenóis totais;

O composto majoritário nos extratos é o ácido gálico, com concentração variando entre 52,02 mg/g e 6,51 mg/g;

Nenhum extrato foi considerado citotóxico para eritrócitos humanos, tendo em vista a alta seletividade para os microrganismos testados;

Todas as amostras perdem umidade até aproximadamente 100 °C e apresentam pico endotérmico semelhante ao do ácido gálico;

A fração hexano foi a que teve o melhor resultado nos ensaios antimicrobianos com CIM menor que as das demais amostras. Isso pode estar relacionado ao fato de que essa fração possui compostos antimicrobianos já relatados na literatura, como o β -Sitosterol, Ácido Hexadecanóico, Ácido Linoleico e Ácido Atrárico;

Além disso, por apresentar compostos com características antioxidantes, a fração pode ser alvo de futuros estudos no campo do tratamento oncológico, principalmente por apresentar o β -Sitosterol em sua composição.

Assim, conclui-se que os extratos da casca da *Schinopsis brasiliensis* Engl. podem ser utilizados como matéria prima para o desenvolvimento de medicamentos odontológicos.

6. REFERÊNCIAS

- 1 Albuquerque UP (2006). Re-examining hypotheses concerning the use and knowledge of medicinal plants: a study in the Caatinga vegetation of NE Brazil. *J Ethnobiol Ethnomed* 2:30.
- 2 Albuquerque UP, Medeiros PM, Almeida ALS, Monteiro JM, Lins-Neto EMF, Melo JG, Santos JP (2007). Medical plants of the *caatinga* (semi-arid) vegetation of NE Brazil: a quantitative approach. *J Ethnopharmacol* 114:325-354.
- 3 Allaker RP, Douglas CWI. Novel anti-microbial therapies for dental plaque-related diseases. *Int J Antimicrob Agents* 2009;33:8-13
- 4 Almeida CFCBR, Lima e Silva TC, Amorim ELC, Maia MBS, Albuquerque UP. Life strategy and chemical composition as predictors of the selection of medicinal plants from *caatinga* (Northeast Brazil). *J Arid Environments*. 2005;62:127-142.
- 5 Al-Oqail M, Hassan WHB, Ahmad MS, Al-Rehaily AJ. Phytochemical and biological studies of *Solanum schimperianum* Hochst. *Saudi Pharmaceutical Journal*. 2012;20:371-379
- 6 Barbosa MIMJ, Borsarelli CD, Mercadante AZ. Light stability of spray-dried bixin encapsulated with different edible polysaccharide preparations. *Food Res. Int.* 200;38:989–994.
- 7 Bézivin C, Tomasi F, Lohézie-Le D, Boustie J (2003). Cytotoxic activity of some lichen extracts on murine and human cancer cell lines. *Phytomed* 10:499-503
- 8 Brasil. Ministério da Saúde. Política Nacional de Práticas Integrativas e Complementares no SUS. Brasília, DF, 2006.
- 9 Cardoso MP, David JM, David JP. A new alkyl phenol from *Schinopsis brasiliensis*. *Nat Prod Res*. 2005;19(5):431-433
- 10 Carvalho PER. Espécies arbóreas brasileiras. Brasília, DF: Embrapa Informação Tecnológica; Colombo: Embrapa Florestas: 2008;3.
- 11 Castro ML, Vilela WR, Zauli RG, Ikegaki M, Rehder VLG, Foglio MA, Alencar SM, Rosalen PL. Bioassay guided purification of the antimicrobial fraction of a brazilian própolis from Bahia state. *BMC Complement Altern Med*. 2009;9:25
- 12 Chandra S, Mejía EG. Polyphenolic Compounds, Antioxidant Capacity, and Quinone Reductase Activity of an Aqueous Extract of *Ardisia compressa* in Comparison to Mate (*Ilex paraguariensis*) and Green (*Camellia sinensis*) Teas. *J Agric Food Chem*. 2004;52:3583-3589.

- 13 Chou YY, Lin TY, Jin JC, Wang NC, Peng MY, Chang FY. Vancomycin-resistant enterococcal bacteremia: comparison of clinical features and outcome between *Enterococcus faecium* and *Enterococcus faecalis*. J Microbiol Immunol Infect 2008;41(2):124-9
- 14 CLSI – Clinical and Laboratory Standards Institute. Reference Dilution Antimicrobial Susceptibility tests for bacteria that grow aerobically; Approved Standard. Vol 29 of CLSI document M07-A8, Wayne, PA, USA. 8th edition, 2009.
- 15 Cruz-Silva MM, Madeira VMC, Almeida LM, Custódio JBA. Hemolysis of human erythrocytes induced by tamoxifen is related to disruption of membrane structure. Biochimica et Biophysica Acta. 2000;1464:41-61.
- 16 Cruz-Silva MM, Madeira VMC, Almeida LM, Custódio JBA. Hydroxytamoxifen interaction with human erythrocytes membrane and induction of permeabilization and subsequent hemolysis. Toxicology in Vitro. 2001;15:612-615.
- 17 Donati M, Mondin A, Chen Z, Miranda FM, Nascimento Júnior BB, Schirato G, Pastore P, Froldi G. Radical scavenging and antimicrobial activities of *Croton zehntneri*, *Pterodon emarginatus* and *Schinopsis brasiliensis* essential oils and their major constituents: estragole, trans-anethole, B-caryophyllene and myrcene. Nat Prod Res. 2014
- 18 Duarte S, Gregoire S, Singh AP, Vorsa N, Schaich K, Bowen WH, Koo H (2006). Inhibitory effects of cranberry polyphenols on formation and acidogenicity of *Streptococcus mutans* biofilms. FEMS Microbiol Lett 257(1):50-6.
- 19 Ercan E, Dalli M, Dülgergil CT. In vitro assessment of the effectiveness of chlorhexidine gel and calcium hydroxide paste with chlorhexidine against *Enterococcus faecalis* and *Candida albicans*. Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod. 2006;102(2):27-31.
- 20 Espíndola ACS, Passos CO, Souza EDA, Santos RA. The Rate of Success or Failure of the Root Canals Treatment. RGO 2002;50(3):164-166.
- 21 Evans M, Davies KJ, Sundqvist G, Figdor D. Mechanisms involved in the resistance of *Enterococcus faecalis* to calcium hydroxide. Int Endod J. 2002;35:221-228.
- 22 Fernandes FHA, Santana CP, Santos RL, Correia LP, Conceição MM, Macêdo RO, Medeiros ACD. Thermal characterization of dried extract of medicinal plant by DSC and analytical techniques. J Therm Anal Calorim. 2013;113:443-447.
- 23 Fisher K, Phillips C. The ecology, epidemiology and virulence of *Enterococcus*. Microbiology 2009;155:1749-1757.

- 24 Ge H, Wang S. Thermal preparation of chitosan-acrylic acid superabsorbent: optimization, characterization and water solubility. *Carbohydrate Polymers*. 2014;113:296-303
- 25 Gomes BP, Souza SF, Ferraz CC, Teixeira FB, Zaia AA, Valdrighi L, Souza-Filho FJ. Effectiveness of 2% chlorhexidine gel and calcium hydroxide against *Enterococcus faecalis* in bovine root dentine in vitro. *Int Endod J*. 2003;36(4):267-75
- 26 Gouvea DR, Gobbo-Neto L, Sakamoto HT, Lopes NP, Lopes JLC, Meloni F, Amaral JG. Seasonal variation of the major secondary metabolites present in the extract of *Eremanthus mattogrossensis* Less (Asteraceae: Vernoniaeae) leaves. *Química Nova*. 2012;35(11)
- 27 Haas AN, Pannuti CM, Andrade AKP, Escobar EC, Almeida ER, Costa FO, Cortelli JR, Cortelli SC, Rode SM, Pedrazzi V, Oppermann RV. Mouthwashes for the control of supragingival biofilm and gingivitis in orthodontic patients: evidence-based recommendations for clinicians. *Braz Oral Res*. 2014;28(1):1-8
- 28 Jones CG. Chlorhexidine: is it still the gold standard? *Periodontol 2000* 1997; 15(1): 55-62.
- 29 Kistler JO, Pesaro M, Wade WG. Development and pyrosequencing analysis of an in vitro oral biofilm model. *BMC Microbiol*. 2015;15:24
- 30 Klein MI, Hwang G, Santos PHS, Campanella OH, Koo H. *Streptococcus mutans*-derived extracellular matrix in cariogenic oral biofilms. *Front Cell Infect Microbiol*. 2015;5:10
- 31 Li M, Wang J, Xu Z. Effect of a variety of chinese herbs and an herb-containing dentifrice on volatile sulfur compounds associated with halitosis: an in vitro analysis. *Current Therapeutic Research*, 2010;71(2):129-40.
- 32 Li X, Svedin E, Mo H, Atwell S, Dilkes BP, Chapple C. Exploiting Natural Variation of Secondary Metabolism Identifies a Gene Controlling the Glycosylation Diversity of Dihydroxybenzoic Acids in *Arabidopsis thaliana*. *Genetics*. 2014; 198(3):1267-1276.
- 33 Lima RF, Alves EP, Rosalen PL, Ruiz ALTG, Duarte MCT, Góes VFF, Medeiros ACD, Pereira JV, Godoy GP, Costa EMMB. Antimicrobial and antiproliferative potential of *Anadenanthera colubrina* (Vell.) Brenan. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*. 2014.
- 34 Lins R, Vasconcelos FHP, Leite RB, Coelho-Soares RS, Barbosa DN. Avaliação Clínica de Bochechos com Extratos de Aroeira (*Schinusterebinthinifolius*) e Camomila

(*Matricaria recutita* L.) Sobre a Placa Bacteriana e a Gengivite. Revista Brasileira de Plantas Mediciniais, 2013;15(1):112-20.

35 Lins RX, Andrade AO, Hirata Júnior R, Wilson MJ, Lewis MAO, Williams DW, Fidel RAS. Antimicrobial resistance and virulence traits of *Enterococcus faecalis* from primary endodontic infections. Journal of Dentistry. 2013;41:779-786.

36 Macedo-Costa MR, Sette-de-Souza PH, Silva JF, Fernandes-Pedrosa MF, Pereira MSV, Lima KC. Phytochemical screening and antibacterial activity of *Solanum paniculatum* Linn. against planktonic oral bacteria. Afr J Microbiol Res. 2014;8:1001-1005.

37 Makkar HPS, Becker K. Vanillin-HCl method for condensed tannins: effect of organic solvents used for extraction of tannins. Journal of Chemical Ecology (1993). 19, 613-621.

38 Marcenes W, Kassebaum NJ, Bernabé E, Flaxman A, Naghavi M, Lopez A, et al. Global burden of oral conditions in 1990-2010: a systematic analysis. J. Dent. Res. 2013;92:592-597.

39 Marsh P, Martin MV. Microbiologia Oral. 4ª ed. São Paulo: Editora Santos; 2005

40 Marsh PD. The role of the daily use of mouthrinses in maintaining oral health. J Dent 2010; 38 (1): 11-15

41 Meda A, Lamien CE, Romito M, Millogo J, Nacoulma OG. Determination of the total phenolic, flavonoid and proline contents in Burkina Fasan honey, as well as their radical scavenging activity. Food Chemistry. 2005;91:571-577.

42 Mohamed JA, Huang DB. Biofilm formation by enterococci. J Med Microbiol 2007;56(12):1581-1588.

43 Moore BD, Andrew RL, Külheim C, Foley WJ. Explaining intraspecific diversity in plant secondary metabolites in an ecological context. New Phytol. 2014;201(3):733-750

44 Pereira EMR, Gomes RT, Freire NR, Aguiar RG, Brandão MGL, Santos VR. *In vitro* Antimicrobial Activity of Brazilian Medicinal Plant Extracts against Pathogenic Microorganisms of Interest to Dentistry. Planta Med. 2011;77(4):401-404

45 Peruchi CTR, França AB, Bispo CGC, Peixoto IF. Efficacy of solventes in the endodontics retreatment of obturation performed with resilon/epiphany. Rev Assoc Paul Cir Dent. 2013;67(1):70-74

46 Pinheiro ET, Gomes BP, Drucker DB, Zaia AA, Ferraz CC, Souza-Filho FJ. Antimicrobial susceptibility of *Enterococcus faecalis* isolated from canals of root filled teeth with periapical lesions. Int Endod J 2004;37:756-763

- 47 Protopopova M, Hanrahan C, Nikonenko B, Samala R, Chen P, Gearhart J, Einck L, Nancy CA (2005). Identification of a new antitubercular drug candidate, SQ 109, from a combinatorial library of 1,2 ethylenediamines. *J Antimicrob Chemother* 56:968-974
- 48 Real DA, Martínez MV, Frattini A, Soazo M, Luque AG, Biasoli MS, Salomon CJ, Olivieri AC, Leonardi D. Design, characterization, and *in vitro* evaluation of antifungal polymeric films. *AAPS Pharm Sci Tech*. 2013;14(1):64-73.
- 49 Reimão JQ, Taniwak NN, Tempore AG (2010). Furazolidone is a selective *in vitro* candidate against *Leishmania (L.) chagasi*: an ultrastructural study. *Parasitol Res* 106:1465-1969
- 50 Reynauld af Geirersstam AH, Ellington MJ, Warner M, Woodford N, Haapasalo M. Antimicrobial susceptibility and molecular analysis of *Enterococcus faecalis* originating from endodontic infections in Finland and Lithuania. *Oral Microbiol Immunol* 2006;21:164-168.
- 51 Rodrigues RAF, Rodrigues MVN, Oliveira TIV, Bueno CZ, Souza IMO, Sartoratto A, Foglio MA. Docosahexaenoic acid ethyl Esther (DHAAE) microcapsule production by spray-drying: optimization by experimental design. *Cienc Tecnol Aliment*. 2011; 31(3):589-596.
- 52 Sallj KM, Oowehand AC. The use of *in vitro* model systems to study dental biofilms associated with caries: a short review. *J Oral Microbiol*. 2015;7:10.
- 53 Santamaria Junior M, Petermann KD, Vedovello SA, Degan V, Lucato A, Franzini CM. Antimicrobial effect of *Melaleuca alternifolia* dental gel in orthodontic patients. *Am J Orthod Dentofacial Orthop*. 2014;145(2):198-202
- 54 Santos CCS, Araújo SS, Santos ALLM, Almeida ECV, Dias AS, Damascena NP, Santos DM, Santos MIS, Júnior KALR, Pereira CKB, Lima ACB, Shan AYKV, Santana AEG, Estevam CS, Araújo BS. Evaluation of the toxicity and molluscicidal and larvicidal activities of *Schinopsis brasiliensis* stem bark extract and its fractions. *Braz J Pharma*. 2014;24:298-303.
- 55 Saraiva AM, Castro RHA, Cordeiro RP, Peixoto Sobrinho TJS, Castro VTNA, Amorim ELC, Xavier HS, Pisciotano MNC. *In vitro* evaluation of antioxidante, antimicrobial and toxicity propeties of extracts of *Schinopsis brasiliensis* Engl. (Anacardiaceae). *Afr J Pharm Pharmacol*. 2011;5(14):1724-1731.
- 56 Saraiva AM, Saraiva CL, Cordeiro RP, Soares RR, Xavier HS, Caetano N. Atividade antimicrobiana e sinérgica das frações das folhas de *Schinopsis brasiliensis* Engl. frente a

clones multirresistentes de *Staphylococcus aureus*. Rev Bras Plantas Med. 2013;15(2):199-207

57 Sassone L, Fidel R, Figueiredo L, Fidel S, Faveri M, Feres M. Evaluation of the microbiota of primary endodontic infections using checkboard DNA-DNA hybridization. Oral Microbiol Immunol 2007;22:390-397.

58 Sava IG, Heinkens E, Huebner J. Pathogenesis and immunity in enterococcal infections. Clin Microbiol Infect 2010;16:533-504

59 Schieber A, Keller P, Carle R (2001). Determination of phenolic acids and flavonoids of apple and pear by high-performance liquid chromatography. J Chromatogr A. 265-273

60 Sedgley CM, Molander A, Flannagan SE, Nagel AC, Appelbe OK, Clewell DB, et al., Virulence, phenotype and genotype characteristics of endodontic *Enterococcus* spp. Oral Microbiol Immunol 2005;20:10-19.

61 Seneviratne CJ, Yip JWY, Chang JWW, Zhang CF, Samaranayake LP. Effect of culture media and nutrients on biofilm growth kinetics of laboratory and clinical strains of *Enterococcus faecalis*. Arch Oral Biol. 2013;58:1327-1334.

62 Sette-de-Souza PH, Carneiro SER, Macedo-Costa MR, Borges SB, Medeiros AR, Fernandes TJO, Amaro-da-Silva LC, Lopes HJC, Lima KC. Antibacterial activity and phytochemical of extracts of *Lippia alba* (Mill). NE Brown. Afr J Microbiol Res. 2014;8:2783-2787

63 Silva MSP, Brandão DO, Chaves TP, Formiga-Filho ALN, Costa EMMB, Santos VL, Medeiros ACD. Study bioprospecting of medicinal plant extracts of the semiarid northeast: contribution to the control of oral microorganisms. Evid Based Complement Alternat Med. 2012;2012:681207.

64 Siqueira JF, Rôças IN. Diversity of endodontic microbiota revisited. J Dent Res 2009;88(11):969-981

65 Skucaite N, Peciuliene V, Vitkauskiene A, Machiulskiene V. Susceptibility of endodontic pathogens to antibiotics in patient with symptomatic apical periodontitis. J Endod 2010;36:611-6

66 Slusarenko AJ, Longland AC, Whitehead IM. Convenient, sensitive and rapid assay for antibacterial activity of phytoalexins. Botanica Helvetica. 1989;99(2):203-207.

67 Sponchiado EC, Pereira JV, Marques AA, Garcia LF, França SC. In vitro assessment of antimicrobial activity of *Pothomorphe umbellata* extracts against *Enterococcus faecalis*. Indian J Dent Res. 2014;25(1):64-68.

- 68 Sundqvist G, Figdor D, Persson S, Sjögren U. Microbiologic analysis of teeth with failed endodontic treatment and the outcome of conservative re-treatment. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 1998;85(1):86-93
- 69 Tamokou JDD, Kuate JR, Tene M, Nwemegwela TJK, Tane P. The antimicrobial activities of extracts and compounds isolated from *Brillantaisia lamium*. *Iran J Med Sci.* 2011;36(1):24-31
- 70 Vinagre NPL, Farias CG, Araújo RJG, Vieira JMS, Silva Júnior JOC, Corrêa AM. Efetividade Clínica de um Enxaguatório Bucal Fitoterápico com Tintura Padronizada de *Calendula officinalis* na Manutenção da Saúde Periodontal. *Revista de Odontologia da UNESP,* 2011;40(1):30-5.
- 71 Wang SF, Shen L, Tong YJ, Chen L, Phang LY, Lim PQ. Biopolymer chitosan/montmorillonite nanocomposites: preparation and characterization. *Polym Degrad Stab.* 2005;90:123-131.
- 72 Willems RJ, Hanage WP, Bessen DE, Feil EJ. Population biology of gram-positive pathogens: high-risk clones for dissemination of antibiotic resistance. *FEMS Microbiol Rev* 2011;35:872-900
- 73 Yousefbeyk F, Gohari AR, Hashemighahderijani Z, Ostad SN, Sourmaghi MHS, Amini M, Golfakhrabadi F, Jamalifar H, Amin G. Bioactive terpenoids and flavonoids from *Daucus littoralis* Smith subsp. *Hyrceanicus* Rech.f, an endemic species of Iran. *DARU J Pharmaceutics Sci.* 2014;22-12.
- 74 Zanatta FB, Rösing CK. Clorexidina: mecanismo de ação e evidências atuais de sua eficácia no contexto do biofilme supragengival. *Scientific-A* 2007;1(2):35-43.
- 75 Zaura E, Keijser BJ, Huse SM, Crielaard W (2009). Defining the healthy “core microbiome” of oral microbial communities. *BMC Microbiol.* 9:259.
- 76 Zhu X, Wang Q, Zhang C, Cheung GS, Shen Y. Prevalence, phenotype, and genotype of *Enterococcus faecalis* isolated from saliva and root canals in patients with persistent apical periodontitis. *Journal of Endodontics* 2010;36:1950-1955

ANEXO A

Archives of Oral Biology is an international journal which aims to publish papers of the highest scientific quality reporting new knowledge from the orofacial region including:

- developmental biology
- cell and molecular biology
- molecular genetics
- immunology
- pathogenesis
- microbiology
- biology of dental caries and periodontal disease
- forensic dentistry
- neuroscience
- comparative anatomy
- paeleodontology

Archives of Oral Biology will also publish expert reviews and articles concerned with advancement in relevant methodologies. The journal will only consider clinical papers where they make a significant contribution to the understanding of a disease process.

These guidelines generally follow the [Uniform Requirements for Manuscripts Submitted to Biomedical Journals](#)

Types of Contribution

Original papers and review articles are welcomed. There will be no differentiation on the basis of length into full or short communications. All submissions will be refereed. Reviews may be submitted in outline prior to full submission.

Page charges

This journal has no page charges.



Before You Begin

Ethics in publishing

For information on Ethics in publishing and Ethical guidelines for journal publication see <http://www.elsevier.com/publishingethics> and <http://www.elsevier.com/journal-authors/ethics>.

Human and animal rights

If the work involves the use of animal or human subjects, the author should ensure that the work described has been carried out in accordance with The Code of Ethics of the World Medical Association (Declaration of Helsinki) for experiments involving humans <http://www.wma.net/en/30publications/10policies/b3/index.html>; EU Directive 2010/63/EU for animal

experiments http://ec.europa.eu/environment/chemicals/lab_animals/legislation_en.htm; Uniform Requirements for manuscripts submitted to Biomedical journals <http://www.icmje.org>. Authors should include a statement in the manuscript that informed consent was obtained for experimentation with human subjects. The privacy rights of human subjects must always be observed.

Conflict of interest

All authors are requested to disclose any actual or potential conflict of interest including any financial, personal or other relationships with other people or organizations within three years of beginning the submitted work that could inappropriately influence, or be perceived to influence, their work. See also <http://www.elsevier.com/conflictsofinterest>. Further information and an example of a Conflict of Interest form can be found at: http://help.elsevier.com/app/answers/detail/a_id/286/p/7923.

Submission declaration and verification

Submission of an article implies that the work described has not been published previously (except in the form of an abstract or as part of a published lecture or academic thesis or as an electronic preprint, see <http://www.elsevier.com/sharingpolicy>), that it is not under consideration for publication elsewhere, that its publication is approved by all authors and tacitly or explicitly by the responsible authorities where the work was carried out, and that, if accepted, it will not be published elsewhere in the same form, in English or in any other language, including electronically without the written consent of the copyright-holder. To verify originality, your article may be checked by the originality detection service CrossCheck <http://www.elsevier.com/editors/plagdetect>.

Contributors

If there are four or more authors, then each is required to declare his or her individual contribution to the article: all authors must have materially participated in the research and/or article preparation, so roles for all authors should be described. The statement that "All authors have read and approved the final article" should be true and included in the disclosure.

Authorship

All authors should have made substantial contributions to all of the following: (1) the conception and design of the study, or acquisition of data, or analysis and interpretation of data, (2) drafting the article or revising it critically for important intellectual content, (3) final approval of the version to be submitted

Copyright

Upon acceptance of an article, authors will be asked to complete a 'Journal Publishing Agreement' (for more information on this and copyright, see <http://www.elsevier.com/copyright>). An e-mail will be sent to the corresponding author confirming receipt of the manuscript together with a 'Journal Publishing Agreement' form or a link to the online version of this agreement.

Subscribers may reproduce tables of contents or prepare lists of articles including abstracts for internal circulation within their institutions. Permission of the Publisher is required for resale or distribution outside the institution and for all other derivative works, including compilations and translations (please consult <http://www.elsevier.com/permissions>). If excerpts from other copyrighted works are included, the author(s) must obtain written permission from the copyright owners and credit the source(s) in the article. Elsevier has preprinted forms for use by authors in these cases: please consult <http://www.elsevier.com/permissions>.

For open access articles: Upon acceptance of an article, authors will be asked to complete an 'Exclusive License Agreement' (for more information see <http://www.elsevier.com/OAauthoragreement>). Permitted third party reuse of open access articles is determined by the author's choice of user license (see <http://www.elsevier.com/openaccesslicenses>).

Author rights

As an author you (or your employer or institution) have certain rights to reuse your work. For more information see <http://www.elsevier.com/copyright>.

Role of the funding source

You are requested to identify who provided financial support for the conduct of the research and/or preparation of the article and to briefly describe the role of the sponsor(s), if any, in study design; in the collection, analysis and interpretation of data; in the writing of the report; and in the decision to submit the article for publication. If the funding source(s) had no such involvement then this should be stated.

Funding body agreements and policies

Elsevier has established a number of agreements with funding bodies which allow authors to comply with their funder's open access policies. Some authors may also be reimbursed for associated publication fees. To learn more about existing agreements please visit <http://www.elsevier.com/fundingbodies>.

After acceptance, open access papers will be published under a noncommercial license. For authors requiring a commercial CC BY license, you can apply after your manuscript is accepted for publication.

Open access

This journal offers authors a choice in publishing their research:

Open access

- Articles are freely available to both subscribers and the wider public with permitted reuse
- An open access publication fee is payable by authors or on their behalf e.g. by their research funder or institution

Subscription

- Articles are made available to subscribers as well as developing countries and patient groups through our universal access programs (<http://www.elsevier.com/access>).
- No open access publication fee payable by authors.

Regardless of how you choose to publish your article, the journal will apply the same peer review criteria and acceptance standards.

For open access articles, permitted third party (re)use is defined by the following Creative Commons user licenses:

Creative Commons Attribution-NonCommercial-NoDerivs (CC BY-NC-ND)

For non-commercial purposes, lets others distribute and copy the article, and to include in a collective work (such as an anthology), as long as they credit the author(s) and provided they do not alter or modify the article.

The open access publication fee for this journal is **USD 2500**, excluding taxes. Learn more about Elsevier's pricing policy: <http://www.elsevier.com/openaccesspricing>.

Language (usage and editing services)

Please write your text in good English (American or British usage is accepted, but not a mixture of these). Authors who feel their English language manuscript may require editing to eliminate possible grammatical or spelling errors and to conform to correct scientific English may wish to use the English Language Editing service available from Elsevier's WebShop (<http://webshop.elsevier.com/languageediting/>) or visit our customer support site (<http://support.elsevier.com>) for more information.

Submission

Our online submission system guides you stepwise through the process of entering your article details and uploading your files. The system converts your article files to a single PDF file used in the peer-review process. Editable files (e.g., Word, LaTeX) are required to typeset your article for final publication. All correspondence, including notification of the Editor's decision and requests for revision, is sent by e-mail.



Preparation

Use of word processing software

It is important that the file be saved in the native format of the word processor used. The text should be in single-column format. Keep the layout of the text as simple as possible. Most formatting codes will be removed and replaced on processing the article. In particular, do not use the word processor's options to justify text or to hyphenate words. However, do use bold face, italics, subscripts, superscripts etc. When preparing tables, if you are using a table grid, use only one grid for each individual table and not a grid for each row. If no grid is used, use tabs, not spaces, to align columns. The electronic text should be prepared in a way very similar to that of conventional manuscripts (see also the Guide to Publishing with Elsevier: <http://www.elsevier.com/guidepublication>). Note that source files of figures, tables and text graphics will be required whether or not you embed your figures in the text. See also the section on Electronic artwork.

To avoid unnecessary errors you are strongly advised to use the 'spell-check' and 'grammar-check' functions of your word processor.

Article structure

Manuscript Structure

Follow this order when typing manuscripts: Title, Authors, Affiliations, Abstract, Keywords, Main text (Introduction, Materials & Methods, Results, Discussion for an original paper), Acknowledgments, Appendix, References, Figure Captions and then Tables. Do not import the Figures or Tables into your text. The corresponding author should be identified with an asterisk and footnote. All other footnotes (except for table footnotes) should be identified with superscript Arabic numbers.

Introduction

This should be a succinct statement of the problem investigated within the context of a brief review of the relevant literature. Literature directly relevant to any inferences or argument presented in the Discussion should in general be reserved for that section. The introduction may conclude with the reason for doing the work but should not state what was done nor the findings.

Materials and Methods

Enough detail must be given here so that another worker can repeat the procedures exactly. Where the materials and methods were exactly as in a previous paper, it is not necessary to repeat all the details but sufficient information must be given for the reader to comprehend what was done without having to consult the earlier work.

Authors are requested to make plain that the conditions of animal and human experimentation are as outlined in the "Ethics" and "Studies on Animals" sections above

Results or Findings

These should be given clearly and concisely. Care should be taken to avoid drawing inferences that belong to the Discussion. Data may be presented in various forms such as histograms or tables but, in view of pressure on space, presentation of the same data in more than one form is unacceptable.

Discussion

This should explore the significance of the results of the work, not repeat them. A combined Results and Discussion section is often appropriate. Avoid extensive citations and discussion of published literature.

Conclusions

The main conclusions of the study may be presented in a short Conclusions section, which may stand alone or form a subsection of a Discussion or Results and Discussion section.

Essential title page information

- **Title.** Concise and informative. Titles are often used in information-retrieval systems. Avoid abbreviations and formulae where possible.
- **Author names and affiliations.** Please clearly indicate the given name(s) and family name(s) of each author and check that all names are accurately spelled. Present the authors' affiliation addresses (where the actual work was done) below the names. Indicate all affiliations with a lower-case superscript letter immediately after the

author's name and in front of the appropriate address. Provide the full postal address of each affiliation, including the country name and, if available, the e-mail address of each author.

- **Corresponding author.** Clearly indicate who will handle correspondence at all stages of refereeing and publication, also post-publication. **Ensure that the e-mail address is given and that contact details are kept up to date by the corresponding author.**

- **Present/permanent address.** If an author has moved since the work described in the article was done, or was visiting at the time, a 'Present address' (or 'Permanent address') may be indicated as a footnote to that author's name. The address at which the author actually did the work must be retained as the main, affiliation address. Superscript Arabic numerals are used for such footnotes.

As titles frequently stand alone in indexes, bibliographic journals etc., and indexing of papers is, to an increasing extent, becoming computerized from key words in the titles, it is important that titles should be as concise and informative as possible. Thus the animal species to which the observations refer should always be given and it is desirable to indicate the type of method on which the observations are based, e.g. chemical, bacteriological, electron-microscopic, histochemical, etc. A "running title" of not more than 40 letters and spaces must also be supplied. A keyword index must be supplied for each paper.

Structured abstract

The paper should be prefaced by an abstract aimed at giving the entire paper in miniature. Abstracts should be no longer than 250 words and should be structured as per the guidelines published in the Journal of the American Medical Association (JAMA 1995; 273: 27-34). In brief, the abstract should be divided into the following sections: (1) Objective; (2) Design - if clinical, to include setting, selection of patients, details on the intervention, outcome measures, etc.; if laboratory research, to include details on methods; (3) Results; (4) Conclusions.

Highlights

Highlights are mandatory for this journal. They consist of a short collection of bullet points that convey the core findings of the article and should be submitted in a separate editable file in the online submission system. Please use 'Highlights' in the file name and include 3 to 5 bullet points (maximum 85 characters, including spaces, per bullet point). See <http://www.elsevier.com/highlights> for examples.

Keywords

Immediately after the abstract, provide a maximum of 6 keywords, using British spelling and avoiding general and plural terms and multiple concepts (avoid, for example, 'and', 'of'). Be sparing with abbreviations: only abbreviations firmly established in the field may be eligible. These keywords will be used for indexing purposes.

Abbreviations

As Archives of Oral Biology is a journal with a multidisciplinary readership,

abbreviations, except those universally understood such as mm, g, min. u.v., w/v and those listed below, should be avoided if possible. Examples of abbreviations which may be used without definition: ADP, AMP, ATP, DEAE-cellulose, DNA, RNA, EDTA, EMG, tris.

Other abbreviations used to improve legibility should be listed as a footnote on the title page. Chemical symbols may be used for elements, groups and simple compounds, but excessive use should be avoided. Abbreviations other than the above should not be used in titles.

Acknowledgements

Collate acknowledgements in a separate section at the end of the article before the references and do not, therefore, include them on the title page, as a footnote to the title or otherwise. List here those individuals who provided help during the research (e.g., providing language help, writing assistance or proof reading the article, etc.).

Bacterial nomenclature

Organisms should be referred to by their scientific names according to the binomial system. When first mentioned the name should be spelt in full and in italics. Afterwards the genus should be abbreviated to its initial letter, e.g. '*S. aureus*' not 'Staph. aureus'. If abbreviation is likely to cause confusion or render the intended meaning unclear, the names of microbes should be spelt in full. Only those names which were included in the Approved List of Bacterial Names, Int J Syst Bacteriol 1980; 30: 225-420 and those which have been validly published in the Int J Syst Bacteriol since 1 January 1980 have standing in nomenclature. If there is good reason to use a name that does not have standing in nomenclature, the names should be enclosed in quotation marks and an appropriate statement concerning the nomenclatural status of the name should be made in the text (for an example see Int J Syst Bacteriol 1980; 30: 547-556). When the genus alone is used as a noun or adjective, use lower case Roman not italic, e.g. 'organisms were staphylococci' and 'streptococcal infection'. If the genus is specifically referred to use italics e.g. 'organisms of the genus *Staphylococcus*'. For genus in plural, use lower case roman e.g. 'salmonellae'; plurals may be anglicized e.g. 'salmonellas'. For trivial names, use lower case Roman e.g. 'meningococcus'

Artwork

Image manipulation

Whilst it is accepted that authors sometimes need to manipulate images for clarity, manipulation for purposes of deception or fraud will be seen as scientific ethical abuse and will be dealt with accordingly. For graphical images, this journal is applying the following policy: no specific feature within an image may be enhanced, obscured, moved, removed, or introduced. Adjustments of brightness, contrast, or color balance are acceptable if and as long as they do not obscure or eliminate any information present in the original. Nonlinear adjustments (e.g. changes to gamma settings) must be disclosed in the figure legend.

Electronic artwork

General points

- Make sure you use uniform lettering and sizing of your original artwork.

- Embed the used fonts if the application provides that option.
- Aim to use the following fonts in your illustrations: Arial, Courier, Times New Roman, Symbol, or use fonts that look similar.
- Number the illustrations according to their sequence in the text.
- Use a logical naming convention for your artwork files.
- Provide captions to illustrations separately.
- Size the illustrations close to the desired dimensions of the published version.
- Submit each illustration as a separate file.

A detailed guide on electronic artwork is available on our website:

<http://www.elsevier.com/artworkinstructions>.

You are urged to visit this site; some excerpts from the detailed information are given here.

Formats

If your electronic artwork is created in a Microsoft Office application (Word, PowerPoint, Excel) then please supply 'as is' in the native document format.

Regardless of the application used other than Microsoft Office, when your electronic artwork is finalized, please 'Save as' or convert the images to one of the following formats (note the resolution requirements for line drawings, halftones, and line/halftone combinations given below):

EPS (or PDF): Vector drawings, embed all used fonts.

TIFF (or JPEG): Color or grayscale photographs (halftones), keep to a minimum of 300 dpi.

TIFF (or JPEG): Bitmapped (pure black & white pixels) line drawings, keep to a minimum of 1000 dpi.

TIFF (or JPEG): Combinations bitmapped line/half-tone (color or grayscale), keep to a minimum of 500 dpi.

Please do not:

- Supply files that are optimized for screen use (e.g., GIF, BMP, PICT, WPG); these typically have a low number of pixels and limited set of colors;
- Supply files that are too low in resolution;
- Submit graphics that are disproportionately large for the content.

Illustration services

Elsevier's WebShop (<http://webshop.elsevier.com/illustrationservices>) offers Illustration Services to authors preparing to submit a manuscript but concerned about the quality of the images accompanying their article. Elsevier's expert illustrators can produce scientific, technical and medical-style images, as well as a full range of charts, tables and graphs. Image 'polishing' is also available, where our illustrators take your image(s) and improve them to a professional standard. Please visit the website to find out more.

Tables

Please submit tables as editable text and not as images. Tables can be placed either next to the relevant text in the article, or on separate page(s) at the end. Number tables consecutively in accordance with their appearance in the text and place any table notes below the table body. Be sparing in the use of tables and ensure that the data presented in them do not duplicate results described elsewhere in the article. Please avoid using vertical rules.

References

All manuscripts should use the 'Vancouver' style for references, which should be numbered consecutively in the order in which they are first cited in the text and listed at the end of the paper.

For journal references, all authors should be included when there are six or fewer (first six followed by 'et al.' when seven or more), followed by the title of article, name of journal abbreviated according to [Index Medicus](#), or left in full, year, volume with part number in brackets, and first and last pages. For example:

1. Walsh NP, Montague JC, Callow N and Rowlands AV. Saliva flow rate, total protein concentration and osmolality as potential markers of whole body hydration status during progressive acute dehydration in humans. *Arch Oral Biol* 2004;49(2):149-154.

For book references, the author(s) should be followed by the chapter title (if appropriate), editor(s) (if applicable), book title, place of publication, publisher, year and page numbers. For example:

Nanci A. Ten Cate's Oral Histology: Development, Structure and Function. 6th ed. St. Louis: Mosby; 2003.

Papers in the course of publication should only be entered in the references if the paper has been accepted by a journal, and then given in the standard manner in the text and list of references but with the words "In press" following the name of the journal.

Reference management software

Most Elsevier journals have a standard template available in key reference management packages. This covers packages using the Citation Style Language, such as Mendeley (<http://www.mendeley.com/features/reference-manager>) and also others like EndNote (<http://www.endnote.com/support/enstyles.asp>) and Reference Manager (<http://refman.com/support/rmstyles.asp>). Using plug-ins to word processing packages which are available from the above sites, authors only need to select the appropriate journal template when preparing their article and the list of references and citations to these will be formatted according to the journal style as described in this Guide. The process of including templates in these packages is constantly ongoing. If the journal you are looking for does not have a template available yet, please see the list of sample references and citations provided in this Guide to help you format these according to the journal style.

If you manage your research with Mendeley Desktop, you can easily install the reference style for this journal by clicking the link below:

<http://open.mendeley.com/use-citation-style/archives-of-oral-biology>

When preparing your manuscript, you will then be able to select this style using the Mendeley plug-ins for Microsoft Word or LibreOffice. For more information about the Citation Style Language, visit <http://citationstyles.org>.

Submission checklist

The following list will be useful during the final checking of an article prior to sending

it to the journal for review. Please consult this Guide for Authors for further details of any item.

Ensure that the following items are present:

One author has been designated as the corresponding author with contact details:

- E-mail address
- Full postal address

All necessary files have been uploaded, and contain:

- Keywords
- All figure captions
- All tables (including title, description, footnotes)

Further considerations

- Manuscript has been 'spell-checked' and 'grammar-checked'
- References are in the correct format for this journal
- All references mentioned in the Reference list are cited in the text, and vice versa
- Permission has been obtained for use of copyrighted material from other sources (including the Internet)

Printed version of figures (if applicable) in color or black-and-white

- Indicate clearly whether or not color or black-and-white in print is required.
- For reproduction in black-and-white, please supply black-and-white versions of the figures for printing purposes.

For any further information please visit our customer support site at <http://support.elsevier.com>.



After Acceptance

Use of the Digital Object Identifier

The Digital Object Identifier (DOI) may be used to cite and link to electronic documents. The DOI consists of a unique alpha-numeric character string which is assigned to a document by the publisher upon the initial electronic publication. The assigned DOI never changes. Therefore, it is an ideal medium for citing a document, particularly 'Articles in press' because they have not yet received their full bibliographic information. Example of a correctly given DOI (in URL format; here an article in the journal *Physics Letters B*):

<http://dx.doi.org/10.1016/j.physletb.2010.09.059>

When you use a DOI to create links to documents on the web, the DOIs are guaranteed never to change.

Online proof correction

Corresponding authors will receive an e-mail with a link to our online proofing system, allowing annotation and correction of proofs online. The environment is similar to MS Word: in addition to editing text, you can also comment on figures/tables and answer questions from the Copy Editor. Web-based proofing provides a faster and less error-prone process by allowing you to directly type your corrections, eliminating the potential introduction of errors.

If preferred, you can still choose to annotate and upload your edits on the PDF version. All instructions for proofing will be given in the e-mail we send to authors, including alternative methods to the online version and PDF.

We will do everything possible to get your article published quickly and accurately. Please use this proof only for checking the typesetting, editing, completeness and correctness of the text, tables and figures. Significant changes to the article as accepted for publication will only be considered at this stage with permission from the Editor. It is important to ensure that all corrections are sent back to us in one communication. Please check carefully before replying, as inclusion of any subsequent corrections cannot be guaranteed. Proofreading is solely your responsibility.

Offprints

The corresponding author, at no cost, will be provided with a personalized link providing 50 days free access to the final published version of the article on [ScienceDirect](#). This link can also be used for sharing via email and social networks. For an extra charge, paper offprints can be ordered via the offprint order form which is sent once the article is accepted for publication. Both corresponding and co-authors may order offprints at any time via Elsevier's WebShop (<http://webshop.elsevier.com/myarticleservices/offprints>). Authors requiring printed copies of multiple articles may use Elsevier WebShop's 'Create Your Own Book' service to collate multiple articles within a single cover (<http://webshop.elsevier.com/myarticleservices/booklets>).

Statistical analysis

Authors should ensure that the presentation and statistical testing of data are appropriate and should seek the advice of a statistician if necessary. A number of common errors should be avoided, e.g.: -

- Use of parametric tests when non-parametric tests are required
- Inconsistencies between summary statistics and statistical tests such as giving means and standard deviations for data which were analysed with non-parametric tests.
- Multiple comparisons undertaken with multiple t tests or non-parametric equivalents rather than with analysis of variance (ANOVA) or non-parametric equivalents.
- Post hoc tests being used following an ANOVA which has yielded a non-significant result.
- Incomplete names for tests (e.g. stating "Student's t test" without qualifying it by stating "single sample", "paired" or "independent sample")
- N values being given in a way which obscures how many independent samples there were (e.g. stating simply $n=50$ when 10 samples/measurements were obtained from each of 5 animals/human subjects).
- Stating that $P=0.000$ (a figure which is generated by some computer packages). The correct statement (in this case) is $P<0.0005$.



Author Inquiries

You can track your submitted article at http://help.elsevier.com/app/answers/detail/a_id/89/p/8045/. You can track your accepted article at <http://www.elsevier.com/trackarticle>. You are also welcome to contact Customer Support via <http://support.elsevier.com>.

ANEXO B

About the Journal

Aims and Scope

The Journal of Microencapsulation is a well-established, peer-reviewed journal dedicated to the publication of original research findings related to the preparation, properties and uses of individually encapsulated novel small particles, as well as significant improvements to tried-and-tested techniques relevant to micro and nano particles and their use in a wide variety of industrial, engineering, pharmaceutical, biotechnology and research applications. Its scope extends beyond conventional microcapsules to all other small particulate systems such as self assembling structures that involve preparative manipulation.

The journal covers:

- the chemistry of encapsulation materials;
- the physics of release through the capsule wall and/or desorption from carrier;
- the techniques of preparation;
- content and storage;
- the many uses to which microcapsules are put.

Nanotechnology is now moving into medicine as nanomedicine; an emerging speciality with great potential in the development of unique opportunities for more refined targeting and for new therapeutic approaches to diagnose and treat life threatening diseases. Therefore, coverage also includes nanotechnological advances in the design and synthesis of these structures and their potential applications. Furthermore, there is an extensive information and reference section found in every issue of the journal comprising patent briefings. This publication is aimed at a broad, interdisciplinary audience of academic and industrial researchers actively engaged in basic and applied laboratory practice, related to engineering micro- and nano-structured particles, including pharmaceutical science, medicine, photographic and copying processes, food technology, agrochemicals, adhesives and all those interested in small particle science and technology.

Manuscript Submission

All submissions should be made online at the Journal of Microencapsulation's ScholarOne Manuscripts site. New users should first create an account. Once a user is logged onto the site, submissions should be made via the Author Center. If you experience any problems with your submission or with the site, please contact ScholarOne support through the „get help now“ link.

All submissions to the journal must include full disclosure of all relationships that could be viewed as presenting a potential conflict of interest. If there are no conflicts of interest, authors should state that there are none. This must be stated at the point of submission (within the manuscript, after the main text under a subheading "Declaration of interest", and, where available within the appropriate field on the journal's ScholarOne Manuscripts site).

Please see our full Declaration of Interest Policy for further information.

Manuscript Preparation

File preparation and types

Manuscripts are preferred in Microsoft Word format (.doc files). Documents must be double-spaced, with margins of one inch on all sides. Tables and figures should not appear in the main text, but should be submitted as separate digital files and designated with the appropriate file type on ScholarOne Manuscripts. References should be given in Harvard style (see References section for example).

Manuscripts should be compiled in the following order: title page; abstract; main text; acknowledgements; Declaration of Interest statement; appendices (as appropriate); references; tables with captions (on separate pages); figures; figure captions (as a list).

Journal of Microencapsulation publishes the following manuscript types:

- Original papers
- Reviews
- Notes
- Letters to the Editor

Title Page

A title page should be provided comprising the manuscript title plus the full names and affiliations of all authors involved in the preparation of the manuscript. One author should be clearly designated as the corresponding author and full contact information, including phone number and email address, provided for this person. Three to six key terms that are not in the title should also be included on the title page. The keywords will assist indexers in cross indexing your article.

Abstract

All original articles and reviews should start with an abstract of 150 or fewer words, summarising the central core of knowledge that is the focus of the paper. The recommended format is as a structured abstract, with the following headings for an original article: context, objective, materials and methods, results, discussion and conclusion. For a review article, it should be structured as follows: context, objective, methods (including data sources, study selection and data extraction), results and conclusion. It should be written in an informative style permitting its use, without revision, by abstracting services, give essential details of research findings without further reference to the text, and avoid generalisations and nonessential information.

Main Text

Original articles

The body of the article should include the following sections: introduction; methods; results; discussion; conclusions.

Introduction: This section should state the relevance and background to the study, and its rationale and purpose. **Methods:** This section should include only information that was available at the time the plan or protocol for the study was being written. You should describe your selection of the observational or experimental participants, identify the methods, apparatus and procedures in sufficient detail to allow others to reproduce the results, and describe statistical methods with enough detail to enable a knowledgeable reader with access to the original data to verify the reported results. Journal of Microencapsulation requires that studies involving humans, both volunteers and patients, or animals be approved by an institutional review board, in accordance with approved published guidelines, prior to actually performing the research and publishing the data. Details including clinical trial registration number must be provided in the methods section if research includes studies conducted on human volunteers. **Results:** Present your results in logical sequence in the text, tables, and illustrations. **Discussion:** This should include implications of the findings and their limitations, with reference to all other relevant studies and the possibilities these suggest for future research. **Conclusions:** This must summarise the main paper. Ensure that extrapolations are reasonable and that conclusions are justified by the data presented, and indicate if the study design can be generalised to a broader study population.

Reviews

The body of a review article should be a comprehensive, scholarly evidence-based review of the literature, accompanied by critical analysis and leading to reasonable conclusions. Wherever appropriate that details of the literature search methodology should be provided, i.e. the databases searched (normally Medline and at least one or two other databases), the search terms and inclusive dates, and any selectivity criteria imposed.

Wherever possible, use primary resources, avoiding “Data on File”, “Poster” or other unpublished references.

Acknowledgement and Declaration of Interest sections

Acknowledgement and Declaration of interest sections are different, and each has a specific purpose. The Acknowledgements sections details special thanks, personal assistance, and dedications. Contributions from individuals who do not qualify for authorship should also be acknowledged here.

Declarations of interest, however, refer to statements of financial support and/or statements of potential conflict of interest. Within this section also belongs disclosure of scientific writing assistance (use of an agency or agency/ freelance writer), grant support and numbers, and statements of employment, if applicable. For a more detailed list of points to include, please see “Declaration of Interest section” below.

Acknowledgement section

Any acknowledgement authors wish to make should be included in a separate headed section at the end of the manuscript preceding any appendices, and before the references section. Please do not incorporate acknowledgement into notes or biographical notes.

Declaration of Interest section

All declarations of interest must be outlined under the subheading „Declaration of interest“. If authors have no declarations of interest to report, this must be explicitly stated. The suggested, but not mandatory, wording in such an instance is: The authors report no declarations of interest. When submitting a paper via ScholarOne Manuscripts, the „Declaration of interest“ field is compulsory (authors must either state the disclosures or report that there are none). If this section is left empty authors will not be able to progress with the submission.

Please see our full Declaration of Interest Policy for further information.

Please note: for NIH/Wellcome-funded papers, the grant number(s) must be included in the Declaration of Interest statement. For more information regarding DOI and NIH policy, please refer to our Author Resources page here.

References

References should be given in the Harvard style. Citation in the text is by author and date (Smith, 2001). The list of references appears alphabetically by primary author's last name. Examples:

- Journal: Iyengar BS, Dorr RT, Remers WA. Chemical basis for the biological activity of Imexon and related Cyanaziridines. *J Med Chem*, 2004;47:218-23.
- Book: Vyas SP, Khar RK. 2001. Targeted and controlled drug delivery. New Delhi, India: CBS Publisher and Distributor.
- Contribution to a Book: Chandrasekaran SK, Benson H, Urquhart J. 1978. Methods to achieve controlled drug delivery: The biomedical engineering approach. In: Robinson JR, ed. Sustained and Controlled Release Drug Delivery Systems. New York: Marcel Dekker 557-93
- Electronic Resources: Lin A-S, Shibano M, Nakagawa-Goto K, Tokuda H, Itokawa H, Morris-Natschke, SL, Lee K-H. 2007. Cancer Preventive Agents. 7. Antitumor-Promoting Effects of Seven Active Flavonolignans from Milk Thistle (*Silybum marianum*) on Epstein-Barr Virus Activation. *Pharm Biol* [Online] Available at: <http://www.informapharmascience.com/doi/abs/10.1080/13880200701585592>. Accessed 12 April 2009.

Periodical abbreviations should follow the style given by Index Medicus.

Tables

Tables should be used only when they can present information more efficiently than running text. Care should be taken to avoid any arrangement that unduly increases the depth of a table, and the column heads should be made as brief as possible, using abbreviations liberally. Lines of data should not be numbered nor run numbers given unless those numbers are needed for reference in the text. Columns should not contain only one or two entries, nor should the same entry be repeated numerous times consecutively. Tables should be grouped at the end of the manuscript on separate pages.

Illustrations

Illustrations (line drawings, halftones, photos, photomicrographs, etc.) should be submitted as digital files for highest quality reproduction and should follow these guidelines:

- 300 dpi or higher
- Sized to fit on journal page
- EPS, JPG, TIFF, or PSD format only
- Submitted as separate files, not embedded in the text
- Legends or captions for figures should be listed on a separate page, double spaced

For information on submitting animations, movie files and sound files or any additional information including indexes and calendars please click [here](#).

For information on colour figures and charges please click [here](#).

Notes on Style

General Style

Authors are asked to take into account the diverse audience of the journal. Please avoid the use of terms that might be meaningful only to a local or national audience, or provide a clear explanation where this is unavoidable. However, papers that reflect the particularities of a social and cultural system are acceptable. Some specific points on style follow:

1. Authors should write in clear, concise UK English. Language and grammar should be consistent with Fowler's English Usage; spelling and meaning of words should conform to Webster's Dictionary. If English is not your native language please ensure the manuscript has been reviewed by a native speaker. Please note: extensive rewriting of the text will not be undertaken by the editorial staff.
2. Latin terminology, including microbiological and species nomenclature, should be italicised.
3. Use standard convention for human and animal genes and proteins: italics for genes and regular font for proteins, and upper case for human products and lower case for animal products.
4. "US" is preferred to "American", "USA" to "United States", and "UK" to "United Kingdom".
5. Double quotation marks rather than single are used unless the "quotation is „within“ another".
6. Punctuation of common abbreviations should adhere to the following conventions: "e.g."; "i.e."; "cf.". Note that such abbreviations should not generally be followed by a comma or a (double) point/period.
7. Upper case characters in headings and references should be used sparingly, e.g. only the first word of paper titles, subheadings and any proper nouns begin upper case; similarly for the titles of papers from journals in the references and elsewhere.

8. Apostrophes should be used sparingly. Thus, decades should be referred to as follows: “The 1980s [not the 1980“s] saw ...”. Possessives associated with acronyms (e.g. APU), should be written as follows: “The APU“s findings that ...” but note that the plural is “APUs”.

9. All acronyms for national agencies, examinations, etc., should be spelled out the first time they are introduced in text or references. Thereafter the acronym can be used if appropriate, e.g. “The work of the Assessment of Performance Unit (APU) in the early 1980s ...” and subsequently, “The APU studies of achievement ...”, in a reference “(Department of Education and Science [DES] 1989a)”.

10. Brief biographical details of significant national figures should be outlined in the text unless it is quite clear that the person concerned would be known internationally. Some suggested editorial comments in a typical text are indicated in the following with square brackets: “From the time of H. E. Armstrong [in the 19th century] to the curriculum development work associated with the Nuffield Foundation [in the 1960s], there has been a shift from constructivism to heurism in the design of [British] science courses”.

11. The preferred local (national) usage for ethnic and other minorities should be used in all papers. For the USA, “African-American”, “Hispanic” and “Native American” are used, e.g. “The African-American presidential candidate, Jesse Jackson ...”; for the UK, “Afro-Caribbean” (not “West Indian”), etc.

12. Material to be emphasised by italicisation in the printed version should be italicised in the typescript rather than underlined. Please use such emphasis sparingly.

13. Numbers in text should take the following forms: 300, 3000, 30 000 (not 30,000). Spell out numbers under 10 unless used with a unit of measure, e.g. nine pupils but 9 mm (do not use full stops (periods) within units). For decimals, use the form 0.05 (not .05, × 05 or 0× 05). “%” (not “per cent”) should be used in typescripts.

14. Appendices should appear before the references section and after any acknowledgements section. The style of the title is shown by the following example: “Appendix C: The random network generator”.

Figures and tables within appendices should continue the sequence of numbering from the main body of the text. Sections within appendices should be numbered, for example, C.1, C.2. Equations in appendices should be numbered, for example, (C 1), (C 2). If there is only one appendix, it is referred to as “the appendix” and not called “Appendix A”.

Abbreviations and nomenclature

For abbreviations and nomenclature, authors should consult the latest edition of the CSE Style Manual available from the Council of Science Editors, 60 Revue Drive, Suite 500 Northbrook, IL, 60062, USA.

Mathematics

Please click [here](#) for more information on the presentation of mathematical text.

Footnotes

Footnotes are not to be used except for designation of the corresponding author of the paper or current address information for an author (if different from that shown in the affiliation). Information concerning grant support of research should appear in a separate Declaration of interest section at the end of the paper. Acknowledgements of the assistance of colleagues or similar notes of appreciation belong in a separate Acknowledgements section.

Footnotes to tables should be typed directly below the table and are indicated by the following symbols: * (asterisk or star), † (dagger), ‡ (double dagger), ¶ (paragraph mark), § (section mark), || (parallels), # (number sign). Reinitialise symbol sequence within tables.

Editorial Policies

Authorship

According to the International Committee on Medical Journal Ethics (ICMJE), an author is defined as one who has made substantial contributions to the conception and development of a manuscript. Informa Pharmaceutical Science adheres to the ICMJE guidelines (<http://www.icmje.org/#author>), which state that “authorship credit should be based on all of the following: 1) substantial contributions to conception and design, acquisition of data, or analysis and interpretation of data; 2) drafting the article or advising it critically for important intellectual content; and 3) final approval of the version to be published”. All other contributors should be listed as acknowledgements.

All submissions are expected to comply with the above definition. Changes to the authorship list after submission will result in a query from the publisher requesting written explanation. Redundant publication and plagiarism

Journal of Microencapsulation considers all manuscripts on the strict condition that they have not been published already, nor are they under consideration for publication or in press elsewhere.

Journal of Microencapsulation will not consider, in general, redundant publications, i.e. “publication of a paper that overlaps substantially with one already published in print or electronic media” (International Committee of Publication Ethics: http://www.icmje.org/publishing_4overlap.html). This rule applies whether the overlapping papers are from the same authors or not.

In addition, Informa has a strict policy against plagiarism. We define plagiarism as the use of extracts from another person's work that are not placed in quotation marks, without the permission of that person, and without acknowledgement to that person (using the appropriate reference style), with the result that your article presents these extracts as original to you. By submitting your work to an Informa Healthcare journal, you warrant that it is your original work, and that you have secured the necessary written permission from the appropriate copyright owner or authority for the reproduction of any illustration or other material.

Paraphrasing, defined as “taking portions of text from one or more sources, crediting the author/s, but only changing one or two words or simply rearranging the order, voice (i.e., active vs. passive) and/or tense of the sentences” by the US Office on Research Integrity (<http://ori.dhhs.gov/education/products/plagiarism/7.shtml>), will not be accepted if found to be used extensively and to make up large sections of the manuscript. Extensive paraphrasing will not be deemed original work and will be viewed as redundant publication and/or plagiarism.

Peer Review

All manuscripts will be subjected to confidential peer review by experts in the field and, on the basis of reviewers’ feedback, papers will be accepted unconditionally, accepted subject to revision or rejected.

Ethics and Consent

Do not use patients' names, initials, or hospital numbers, especially in illustrative material. Identifying information should not be published in written descriptions, photographs, and pedigrees unless the information is essential for scientific purposes and the patient (or parent or guardian) gives written informed

consent for publication. Informed consent for this purpose requires that the patient be shown the manuscript to be published.

Papers including animal experiments or clinical trials must be conducted with approval by the local animal care or human subject committees, respectively (see below).

To comply with FDAAA legislation, Informa Pharmaceutical Science requires trial registration as a condition of publication for all studies involving clinical trials. Trial registration numbers should be included in the abstract, with full details provided in the methods section. Uniform Requirements for Manuscripts Submitted to Biomedical Journals: Writing and Editing for Biomedical Publication. Available at: <http://www.icmje.org/>

All manuscripts, except reviews, must include a statement in the Introduction or Methods section that the study was approved by an Investigational Review Board (Human Studies Committee or Ethics Committee or Animal Care and Use Committee), if applicable. Authors who do not have formal ethics review committees should include a statement that their study followed principles in the Declaration of Helsinki (<http://www.wma.net/e/policy/b3.htm>).

When a product has not yet been approved by an appropriate regulatory body for the use described in the manuscript, the author must specify that the product is not approved for the use under discussion or that the product is still under investigation.

Further information on Ethics and Consent can be found by clicking [here](#)

Copyright and Permissions

It is a condition of publication that authors assign copyright or license the publication rights in their articles, including abstracts, to Informa UK Ltd. This enables us to ensure full copyright protection and to disseminate the article, and the Journal, to the widest possible readership in print and electronic formats as appropriate. Authors may, of course, use the article elsewhere after publication without prior permission from Informa UK Ltd., provided that acknowledgement is given to the Journal as the original source of publication, and that Informa Pharmaceutical Science is notified so that our records show that its use is properly authorised. Authors retain a number of other rights under the Informa UK Ltd. rights policies documents.

Authors are required to sign an agreement for the transfer of copyright to the publisher. All accepted manuscripts, artwork, and photographs become the property of the publisher. A copyright agreement form can be downloaded by corresponding authors of accepted manuscripts with proofs. This should be signed and returned to Informa Pharmaceutical Science.

Authors are themselves responsible for obtaining permission to reproduce copyright material from other sources.

Further information on Permissions can be found by clicking [here](#).

Declaration of Interest

It is the policy of all Informa Pharmaceutical Science, to adhere in principle to the Conflict of Interest policy recommended by the ICMJE. All authors must disclose any financial and personal relationships with other people or organizations that could inappropriately influence (bias) their work. It is the sole responsibility of authors to disclose any affiliation with any organization with a financial interest, direct or indirect, in the subject matter or materials discussed in the manuscript (such as consultancies, employment, paid expert testimony, honoraria, speakers bureaus, retainers, stock options or ownership, patents or patent applications or travel grants) that may affect the conduct or reporting of the work submitted. All sources of funding for research are to be explicitly stated. If uncertain as to what might be considered a potential conflict of interest, authors should err on the side of full disclosure.

If there are no declarations, authors should explicitly state that there are none. This must be stated at the point of submission (within the manuscript, after the main text, under a subheading "Declaration of interest", and within the appropriate field on the journal's ScholarOne Manuscripts site). Manuscript submission cannot be completed unless a declaration of interest statement (either stating the disclosures or reporting that there are none) is included.

This will be made available to reviewers and will appear in the published article. If any potential conflicts of interest are found to have been withheld following publication, the journal will proceed according to COPE guidance.

The intent of this policy is not to prevent authors with any particular relationship or interest from publishing their work, but rather to adopt transparency such that reviewers, editors, the publisher, and most importantly, readers can make objective judgements the work product.

Additional Information

Proofs

Usual practice will involve corresponding authors receiving email notification with a password and web address from which to download a PDF. Hard copies of proofs will not be mailed. To avoid delays in publication, corrections to proofs must be returned within 48 hours, by electronic transmittal, fax or mail. Authors will be charged for excessive correction at this stage of production. If authors do not return page proofs promptly, the Publisher reserves the choice to either delay publication to a subsequent issue or to proceed to press without author corrections. The Publisher reserves the right to proceed to press without submitting page proofs to the author.

Reprints

Each corresponding author will receive a PDF file of the final version of their article. Reprints of individual articles are available for order at the time authors review page proofs. A discount on reprints is available to authors who order before print publication. Copies of the journal can be purchased at the author's preferential rate of \$25/£15 per copy.

Further information on Reprints can be found by [clicking here](#).

Contact the publisher

[Click here for contact details for the Publisher](#)

ANEXO C

The *Journal of Endodontics* is owned by the American Association of Endodontists. Submitted manuscripts must pertain to endodontics and may be original research (eg, clinical trials, basic science related to the biological aspects of endodontics, basic science related to endodontic techniques, case reports, or review articles related to the scientific or applied aspects of endodontics). Clinical studies using CONSORT methods (⇒ <http://www.consort-statement.org/consort-statement/>) or systematic reviews using meta-analyses are particularly encouraged. Authors of potential review articles are encouraged to first contact the Editor during their preliminary development via e-mail at *JEndodontics@UTHSCSA.edu*. Manuscripts submitted for publication must be submitted solely to *JOE*. They must not be submitted for consideration elsewhere or be published elsewhere.

Disclaimer

The statements, opinions, and advertisements in the *Journal of Endodontics* are solely those of the individual authors, contributors, editors, or advertisers, as indicated. Those statements, opinions, and advertisements do not affect any endorsement by the American Association of Endodontists or its agents, authors, contributors, editors, or advertisers, or the publisher. Unless otherwise specified, the American Association of Endodontists and the publisher disclaim any and all responsibility or liability for such material.



Before You Begin

Ethics in publishing

For information on Ethics in publishing and Ethical guidelines for journal publication see ⇒ <http://www.elsevier.com/publishingethics> and ⇒ <http://www.elsevier.com/journal-authors/ethics>.

Human and animal rights

If the work involves the use of animal or human subjects, the author should ensure that the work described has been carried out in accordance with The Code of Ethics of the World Medical Association (Declaration of Helsinki) for experiments involving humans ⇒ <http://www.wma.net/en/30publications/10policies/b3/index.html>; EU Directive 2010/63/EU for animal experiments ⇒ http://ec.europa.eu/environment/chemicals/lab_animals/legislation_en.htm; Uniform Requirements for manuscripts submitted to Biomedical journals ⇒ <http://www.icmje.org>. Authors should include a statement in the manuscript that informed consent was obtained for experimentation with human subjects. The privacy rights of human subjects must always be observed.

Conflict of interest

All authors must disclose any financial and personal relationships with other people or organizations that could inappropriately influence (bias) their work. Examples of potential conflicts of interest include employment, consultancies, stock ownership, honoraria, paid expert testimony, patent applications/registrations, and grants or other funding. If there are no conflicts of interest then please state this: 'Conflicts of interest: none'. See also <http://www.elsevier.com/conflictsofinterest>. Further information and an example of a Conflict of Interest form can be found at: http://help.elsevier.com/app/answers/detail/a_id/286/p/7923.

Submission declaration and verification

Submission of an article implies that the work described has not been published previously (except in the form of an abstract or as part of a published lecture or academic thesis or as an electronic preprint, see <http://www.elsevier.com/sharingpolicy>), that it is not under consideration for publication elsewhere, that its publication is approved by all authors and tacitly or explicitly by the responsible authorities where the work was carried out, and that, if accepted, it will not be published elsewhere in the same form, in English or in any other language, including electronically without the written consent of the copyright-holder. To verify originality, your article may be checked by the originality detection service CrossCheck <http://www.elsevier.com/editors/plagdetect>.

Changes to authorship

This policy concerns the addition, deletion, or rearrangement of author names in the authorship of accepted manuscripts:

Before the accepted manuscript is published in an online issue: Requests to add or remove an author, or to rearrange the author names, must be sent to the Journal Manager from the corresponding author of the accepted manuscript and must include: (a) the reason the name should be added or removed, or the author names rearranged and (b) written confirmation (e-mail, fax, letter) from all authors that they agree with the addition, removal or rearrangement. In the case of addition or removal of authors, this includes confirmation from the author being added or removed. Requests that are not sent by the corresponding author will be forwarded by the Journal Manager to the corresponding author, who must follow the procedure as described above. Note that: (1) Journal Managers will inform the Journal Editors of any such requests and (2) publication of the accepted manuscript in an online issue is suspended until authorship has been agreed.

After the accepted manuscript is published in an online issue: Any requests to add, delete, or rearrange author names in an article published in an online issue will follow the same policies as noted above and result in a corrigendum.

Reporting clinical trials

Randomized controlled trials should be presented according to the CONSORT guidelines. At manuscript submission, authors must provide the CONSORT checklist accompanied by a flow diagram that illustrates the progress of patients through the trial, including recruitment, enrollment, randomization, withdrawal and completion, and a detailed description of the randomization procedure. The CONSORT checklist and

template flow diagram can be found on <http://www.consort-statement.org>.

Copyright

Upon acceptance of an article, authors will be asked to complete a 'Journal Publishing Agreement' (for more information on this and copyright, see <http://www.elsevier.com/copyright>). An e-mail will be sent to the corresponding author confirming receipt of the manuscript together with a 'Journal Publishing Agreement' form or a link to the online version of this agreement.

Subscribers may reproduce tables of contents or prepare lists of articles including abstracts for internal circulation within their institutions. Permission of the Publisher is required for resale or distribution outside the institution and for all other derivative works, including compilations and translations (please consult <http://www.elsevier.com/permissions>). If excerpts from other copyrighted works are included, the author(s) must obtain written permission from the copyright owners and credit the source(s) in the article. Elsevier has preprinted forms for use by authors in these cases: please consult <http://www.elsevier.com/permissions>.

For open access articles: Upon acceptance of an article, authors will be asked to complete an 'Exclusive License Agreement' (for more information see <http://www.elsevier.com/OAauthoragreement>). Permitted third party reuse of open access articles is determined by the author's choice of user license (see <http://www.elsevier.com/openaccesslicenses>).

Author rights

As an author you (or your employer or institution) have certain rights to reuse your work. For more information see <http://www.elsevier.com/copyright>.

Role of the funding source

You are requested to identify who provided financial support for the conduct of the research and/or preparation of the article and to briefly describe the role of the sponsor(s), if any, in study design; in the collection, analysis and interpretation of data; in the writing of the report; and in the decision to submit the article for publication. If the funding source(s) had no such involvement then this should be stated.

Funding body agreements and policies

Elsevier has established a number of agreements with funding bodies which allow authors to comply with their funder's open access policies. Some authors may also be reimbursed for associated publication fees. To learn more about existing agreements please visit <http://www.elsevier.com/fundingbodies>.

Language (usage and editing services)

Please write your text in good English (American or British usage is accepted, but not a mixture of these). Authors who feel their English language manuscript may require editing to eliminate possible grammatical or spelling errors and to conform to correct scientific English may wish to use the English Language Editing service available from

Elsevier's WebShop (⇒<http://webshop.elsevier.com/languageediting/>) or visit our customer support site (⇒<http://support.elsevier.com>) for more information.

Submission

Our online submission system guides you stepwise through the process of entering your article details and uploading your files. The system converts your article files to a single PDF file used in the peer-review process. Editable files (e.g., Word, LaTeX) are required to typeset your article for final publication. All correspondence, including notification of the Editor's decision and requests for revision, is sent by e-mail.

Submit your article

Please submit your article via ⇒ <http://ees.elsevier.com/joe/>.



Preparation

General Points on Composition

Authors are strongly encouraged to analyze their final draft with both software (eg, spelling and grammar programs) and colleagues who have expertise in English grammar. References listed at the end of this section provide a more extensive review of rules of English grammar and guidelines for writing a scientific article. Always remember that clarity is the most important feature of scientific writing. Scientific articles must be clear and precise in their content and concise in their delivery because their purpose is to inform the reader. The Editor reserves the right to edit all manuscripts or to reject those manuscripts that lack clarity or precision or that have unacceptable grammar or syntax. The following list represents common errors in manuscripts submitted to the Journal of Endodontics:

- a. The paragraph is the ideal unit of organization. Paragraphs typically start with an introductory sentence that is followed by sentences that describe additional detail or examples. The last sentence of the paragraph provides conclusions and forms a transition to the next paragraph. Common problems include one-sentence paragraphs, sentences that do not develop the theme of the paragraph (see also section “c,” below), or sentences with little to no transition within a paragraph.
- b. Keep to the point. The subject of the sentence should support the subject of the paragraph. For example, the introduction of authors' names in a sentence changes the subject and lengthens the text. In a paragraph on sodium hypochlorite, the sentence, “In 1983, Langeland et al, reported that sodium hypochlorite acts as a lubricating factor during instrumentation and helps to flush debris from the root canals” can be edited to: “Sodium hypochlorite acts as a lubricant during instrumentation and as a vehicle for flushing the generated debris (Langeland et al, 1983).” In this example, the paragraph's subject is sodium hypochlorite and sentences should focus on this subject.
- c. Sentences are stronger when written in the active voice, that is, the subject performs the action. Passive sentences are identified by the use of passive verbs such as “was,”

“were,” “could,” etc. For example: “Dexamethasone was found in this study to be a factor that was associated with reduced inflammation,” can be edited to: “Our results demonstrated that dexamethasone reduced inflammation.” Sentences written in a direct and active voice are generally more powerful and shorter than sentences written in the passive voice.

d. Reduce verbiage. Short sentences are easier to understand. The inclusion of unnecessary words is often associated with the use of a passive voice, a lack of focus, or run-on sentences. This is not to imply that all sentences need be short or even the same length. Indeed, variation in sentence structure and length often helps to maintain reader interest. However, make all words count. A more formal way of stating this point is that the use of subordinate clauses adds variety and information when constructing a paragraph. (This section was written deliberately with sentences of varying length to illustrate this point.)

e. Use parallel construction to express related ideas. For example, the sentence, “Formerly, endodontics was taught by hand instrumentation, while now rotary instrumentation is the common method,” can be edited to “Formerly, endodontics was taught using hand instrumentation; now it is commonly taught using rotary instrumentation.” The use of parallel construction in sentences simply means that similar ideas are expressed in similar ways, and this helps the reader recognize that the ideas are related.

f. Keep modifying phrases close to the word that they modify. This is a common problem in complex sentences that may confuse the reader. For example, the statement, “Accordingly, when conclusions are drawn from the results of this study, caution must be used,” can be edited to “Caution must be used when conclusions are drawn from the results of this study.”

g. To summarize these points, effective sentences are clear and precise, and often are short, simple and focused on one key point that supports the paragraph’s theme.

h. Authors should be aware that the JOE uses iThenticate, plagiarism detection software, to ensure originality and integrity of material published in the journal. The use of copied sentences, even when present within quotation marks, is highly discouraged. Instead, the information of the original research should be expressed by the new manuscript author’s own words, and a proper citation given at the end of the sentence. Plagiarism will not be tolerated and manuscripts will be rejected or papers withdrawn after publication based on unethical actions by the authors. In addition, authors may be sanctioned for future publication.

Use of word processing software

It is important that the file be saved in the native format of the word processor used. The text should be in single-column format. Keep the layout of the text as simple as possible. Most formatting codes will be removed and replaced on processing the article. In particular, do not use the word processor's options to justify text or to hyphenate words. However, do use bold face, italics, subscripts, superscripts etc. When preparing tables, if you are using a table grid, use only one grid for each individual table and not a grid for each row. If no grid is used, use tabs, not spaces, to align columns. The

electronic text should be prepared in a way very similar to that of conventional manuscripts (see also the Guide to Publishing with Elsevier: <http://www.elsevier.com/guidepublication>). Note that source files of figures, tables and text graphics will be required whether or not you embed your figures in the text. See also the section on Electronic artwork.

To avoid unnecessary errors you are strongly advised to use the 'spell-check' and 'grammar-check' functions of your word processor.

Essential title page information

- **Title.** Concise and informative. Titles are often used in information-retrieval systems. Avoid abbreviations and formulae where possible.
- **Author names and affiliations.** Please clearly indicate the given name(s) and family name(s) of each author and check that all names are accurately spelled. Present the authors' affiliation addresses (where the actual work was done) below the names. Indicate all affiliations with a lower-case superscript letter immediately after the author's name and in front of the appropriate address. Provide the full postal address of each affiliation, including the country name and, if available, the e-mail address of each author.
- **Corresponding author.** Clearly indicate who will handle correspondence at all stages of refereeing and publication, also post-publication. **Ensure that the e-mail address is given and that contact details are kept up to date by the corresponding author.**
- **Present/permanent address.** If an author has moved since the work described in the article was done, or was visiting at the time, a 'Present address' (or 'Permanent address') may be indicated as a footnote to that author's name. The address at which the author actually did the work must be retained as the main, affiliation address. Superscript Arabic numerals are used for such footnotes.

Structured abstract

A structured abstract, by means of appropriate headings, should provide the context or background for the research and should state its purpose, basic procedures (selection of study subjects or laboratory animals, observational and analytical methods), main findings (giving specific effect sizes and their statistical significance, if possible), and principal conclusions. It should emphasize new and important aspects of the study or observations.

Abstract Headings

Introduction, Methods, Results, Conclusions

Keywords

Immediately after the abstract, provide a maximum of 6 keywords, using American spelling and avoiding general and plural terms and multiple concepts (avoid, for example, 'and', 'of'). Be sparing with abbreviations: only abbreviations firmly established in the field may be eligible. These keywords will be used for indexing purposes.

Acknowledgements

Collate acknowledgements in a separate section at the end of the article before the references and do not, therefore, include them on the title page, as a footnote to the title or otherwise. List here those individuals who provided help during the research (e.g., providing language help, writing assistance or proof reading the article, etc.).

The authors deny any conflicts of interest related to this study.

Original Research Article Guidelines

Title Page

The title describes the major emphasis of the paper. It must be as short as possible without loss of clarity. Avoid abbreviations in the title because this may lead to imprecise coding by electronic citation programs such as PubMed (eg, use sodium hypochlorite rather than NaOCl). The author list must conform to published standards on authorship (see authorship criteria in the Uniform Requirements for Manuscripts Submitted to Biomedical Journals at www.icmje.org). Include the manuscript title; the names and affiliations of all authors; and the name, affiliation, and full mailing address (including e-mail) of the corresponding author. This author will be responsible for proofreading page proofs and ordering reprints when applicable. Also highlight the contribution of each author in the cover letter.

Abstract

The Abstract concisely describes the purpose of the study in 250 or fewer words. It must be organized into sections: Introduction, Methods, Results, and Conclusions. The hypothesis is described in the Abstract Introduction. The Abstract describes the new contributions made by this study. The Abstract word limitation and its wide distribution (eg, PubMed) make it challenging to write clearly. This section is written last by many authors. Write the abstract in past tense because the study has been completed. Provide 3-5 keywords.

Introduction

The introduction briefly reviews the pertinent literature in order to identify the gap in knowledge that the study is intended to address and the limitations of previous studies in the area. Clearly describe the purpose of the study, the tested hypothesis, and its scope. Many successful manuscripts require no more than a few paragraphs to accomplish these goals; therefore, do not perform extensive literature review or discuss the results of the study in this section.

Materials and Methods

The Materials and Methods section is intended to permit other investigators to repeat your experiments. There are 4 components to this section: (1) detailed description of the materials used and their components, (2) experimental design, (3) procedures employed, and (4) statistical tests used to analyze the results. Most manuscripts should cite prior

studies that used similar methods and succinctly describe the essential aspects used in the present study. A "methods figure" will be rejected unless the procedure is novel and requires an illustration for comprehension. If the method is novel, then you must carefully describe the method and include validation experiments. If the study used a commercial product, the manuscript must either state that you followed manufacturer's protocol or specify any changes made to the protocol. If the study used an *in vitro* model to simulate a clinical outcome, describe either experiments made to validate the model or previous literature that proved the clinical relevance of the model. The statistical analysis section must describe which tests were used to analyze which dependent measures; *P* values must be specified. Additional details may include randomization scheme, stratification (if any), power analysis as a basis for sample size computation, dropouts from clinical trials, the effects of important confounding variables, and bivariate versus multivariate analysis.

Results

Only experimental results are appropriate in this section; do not include methods, discussion, or conclusions. Include only those data that are critical for the study, as defined by the aim(s). Do not include all available data without justification; any repetitive findings will be rejected from publication. All Figures, Charts, and Tables must be cited in the text in numerical order and include a brief description of the major findings. Consider using Supplemental Figures, Tables, or Video clips that will be published online. Supplemental material often is used to provide additional information or control experiments that support the results section (eg, microarray data).

Figures

There are 2 general types of figures: type 1 includes photographs, radiographs, or micrographs; type 2 includes graphs. *Type 1*: Include only essential figures and use composite figures containing several panels of photographs, if possible. Each panel must be clearly identified with a letter (eg, A, B, C), and the parts must be defined in the figure legend. A figure that contains many panels counts as 1 figure. *Type 2*: Graphs (ie, line drawings including bar graphs) that plot a dependent measure (on the Y axis) as a function of an independent measure (usually plotted on the X axis). One example is a graph depicting pain scores over time. Use graphs when the overall trend of the results is more important than the exact numeric values of the results. A graph is a convenient way to report that an ibuprofen-treated group reported less pain than a placebo-treated group over the first 24 hours, but pain reported was the same for both groups over the next 96 hours. In this case, the trend of the results is the primary finding; the actual pain scores are not as critical as the relative differences between the NSAID and placebo groups.

Tables

Tables are appropriate when it is critical to present exact numeric values; however, not all results need be placed in either a table or figure. Instead of a simple table, the results could state that there was no inhibition of growth from 0.001%-0.03% NaOCl, and a 100% inhibition of growth from 0.03%-3% NaOCl (N=5/group). If the results are not significant, then it is probably not necessary to include the results in either a table or as a figure.

Acknowledgments

All authors must affirm that they have no financial affiliation (eg, employment, direct payment, stock holdings, retainers, consultantships, patent licensing arrangements, or honoraria), or involvement with any commercial organization with direct financial interest in the subject or materials discussed in this manuscript, nor have any such arrangements existed in the past 3 years. Disclose any potential conflict of interest. Append a paragraph to the manuscript that fully discloses any financial or other interest that poses a conflict. Disclose all sources and attribute all grants, contracts, or donations that funded the study. Specific wording: "The authors deny any conflicts of interest related to this study."

References

The reference style can be learned from reading past issues of *JOE*. References are numbered in order of citation. Place text citation of the reference Arabic number in parentheses at the end of a sentence or at the end of a clause that requires a literature citation. Do not use superscript for references. Original reports are limited to 35 references. There are no limits in the number of references for review articles.

Other Article Types and Guidelines

Manuscripts submitted to *JOE* that are not Original Articles must fall into one of the following categories. Abstract limit: 250 words. Note that word limits, listed by type, do not include figure legends or References. If you are not sure whether your manuscript falls within one of the categories listed or if you would like to request pre-approval to submit additional figures, contact the Editor at JEndodontics@uthscsa.edu.

CONSORT Randomized Clinical Trial

Must strictly adhere to the Consolidated Standards of Reporting Trials—CONSORT—minimum guidelines for publication of randomized clinical trials (<http://www.consort-statement.org>). Word limit: 3500. Headings: Abstract, Introduction, Materials and Methods, Results, Discussion, Acknowledgments. Maximum number of figures: 4. Maximum number of tables: 4.

Review Article

Either narrative articles or systemic reviews/meta-analyses. Case Report/Clinical Techniques articles, even when they include an extensive review of the literature, are categorized as Case Report/Clinical Techniques. Word limit: 3500. Headings: Abstract, Introduction, Discussion, Acknowledgments. Maximum number of figures: 4. Maximum number of tables: 4.

Clinical Research

Prospective or retrospective studies of patients or patient records, research on biopsies excluding the use of human teeth for technique studies. Word limit: 3500. Headings: Abstract, Introduction, Materials and Methods, Results, Discussion, Acknowledgments.

Maximum number of figures: 4. Maximum number of tables: 4.

Basic Research—Biology

Animal or culture studies of biological research on physiology, development, stem cell differentiation, inflammation, or pathology. Primary focus is on biology. Word limit: 2500. Headings: Abstract, Introduction, Materials and Methods, Results, Discussion, Acknowledgments. Maximum number of figures: 4. Maximum number of tables: 4.

Basic Research—Technology

Focus primarily on research related to techniques and materials used, or on potential clinical use, in endodontics. Word limit: 2500. Headings: Abstract, Introduction, Material and Methods, Results, Discussion, Acknowledgments. Maximum number of figures: 3. Maximum number of tables: 3.

Case Report/Clinical Techniques

Reports of an unusual clinical case or use of a cutting edge technology in a clinical case. Word limit: 2500. Headings: Abstract, Introduction, Materials and Methods, Results, Discussion, Acknowledgments. Maximum number of figures: 4. Maximum number of tables: 4.

Units

Follow internationally accepted rules and conventions: use the international system of units (SI). If other units are mentioned, please give their equivalent in SI.

Artwork

Electronic artwork

General points

- Make sure you use uniform lettering and sizing of your original artwork.
- Embed the used fonts if the application provides that option.
- Aim to use the following fonts in your illustrations: Arial, Courier, Times New Roman, Symbol, or use fonts that look similar.
- Number the illustrations according to their sequence in the text.
- Use a logical naming convention for your artwork files.
- Provide captions to illustrations separately.
- Size the illustrations close to the desired dimensions of the published version.
- Submit each illustration as a separate file.

A detailed guide on electronic artwork is available on our website:

➡ <http://www.elsevier.com/artworkinstructions>.

You are urged to visit this site; some excerpts from the detailed information are given here.

Formats

If your electronic artwork is created in a Microsoft Office application (Word,

PowerPoint, Excel) then please supply 'as is' in the native document format. Regardless of the application used other than Microsoft Office, when your electronic artwork is finalized, please 'Save as' or convert the images to one of the following formats (note the resolution requirements for line drawings, halftones, and line/halftone combinations given below):

EPS (or PDF): Vector drawings, embed all used fonts.

TIFF (or JPEG): Color or grayscale photographs (halftones), keep to a minimum of 300 dpi.

TIFF (or JPEG): Bitmapped (pure black & white pixels) line drawings, keep to a minimum of 1000 dpi.

TIFF (or JPEG): Combinations bitmapped line/half-tone (color or grayscale), keep to a minimum of 500 dpi.

Please do not:

- Supply files that are optimized for screen use (e.g., GIF, BMP, PICT, WPG); these typically have a low number of pixels and limited set of colors;
- Supply files that are too low in resolution;
- Submit graphics that are disproportionately large for the content.

Color artwork

Please make sure that artwork files are in an acceptable format (TIFF (or JPEG), EPS (or PDF) or MS Office files) and with the correct resolution. If, together with your accepted article, you submit usable color figures then Elsevier will ensure, at no additional charge, that these figures will appear in color online (e.g., ScienceDirect and other sites) in addition to color reproduction in print. For further information on the preparation of electronic artwork, please see <http://www.elsevier.com/artworkinstructions>.

Figure captions

Ensure that each illustration has a caption. Supply captions separately, not attached to the figure. A caption should comprise a brief title (**not** on the figure itself) and a description of the illustration. Keep text in the illustrations themselves to a minimum but explain all symbols and abbreviations used.

Tables

Please submit tables as editable text and not as images. Tables can be placed either next to the relevant text in the article, or on separate page(s) at the end. Number tables consecutively in accordance with their appearance in the text and place any table notes below the table body. Be sparing in the use of tables and ensure that the data presented in them do not duplicate results described elsewhere in the article. Please avoid using vertical rules.

References

Please ensure that every reference cited in the text is also present in the reference list (and vice versa). Any references cited in the abstract must be given in full. Unpublished

results and personal communications are not allowed in the reference list, but they may be mentioned in the text. Citation of a reference as "in press" implies that the item has been accepted for publication.

Reference links

Increased discoverability of research and high quality peer review are ensured by online links to the sources cited. In order to allow us to create links to abstracting and indexing services, such as Scopus, CrossRef and PubMed, please ensure that data provided in the references are correct. Please note that incorrect surnames, journal/book titles, publication year and pagination may prevent link creation. When copying references, please be careful as they may already contain errors. Use of the DOI is encouraged.

Web References

As a minimum, the full URL should be given and the date when the reference was last accessed. Any further information, if known (DOI, author names, dates, reference to a source publication, etc.), should also be given. Web references are included in the reference list.

References in a special issue

Please ensure that the words 'this issue' are added to any references in the list (and any citations in the text) to other articles in the same Special Issue.

Reference management software

Most Elsevier journals have a standard template available in key reference management packages. This covers packages using the Citation Style Language, such as Mendeley (⇒ <http://www.mendeley.com/features/reference-manager>) and also others like EndNote (⇒ <http://www.endnote.com/support/enstyles.asp>) and Reference Manager (⇒ <http://refman.com/support/rmstyles.asp>). Using plug-ins to word processing packages which are available from the above sites, authors only need to select the appropriate journal template when preparing their article and the list of references and citations to these will be formatted according to the journal style as described in this Guide. The process of including templates in these packages is constantly ongoing. If the journal you are looking for does not have a template available yet, please see the list of sample references and citations provided in this Guide to help you format these according to the journal style.

If you manage your research with Mendeley Desktop, you can easily install the reference style for this journal by clicking the link below:

⇒ <http://open.mendeley.com/use-citation-style/journal-of-endodontics>

When preparing your manuscript, you will then be able to select this style using the Mendeley plug-ins for Microsoft Word or LibreOffice. For more information about the Citation Style Language, visit ⇒ <http://citationstyles.org>.

Reference style

Text: Indicate references by Arabic numerals in parentheses, numbered in the order in

which they appear in the text. *List*: Number the references in the list in the order in which they appear in the text. List 3 authors then et al.

Examples:

Journal article:

1. Van der Geer J, Hanraads JAJ, Lupton RA. The art of writing a scientific article. *J Sci Commun*. 2010;163:51–59.

Book:

2. Strunk W Jr, White EB. *The Elements of Style*, 4th ed. New York: Longman; 2000.

Chapter in an edited book:

3. Mettam GR, Adams LB. How to prepare an electronic version of your article. In: Jones BS, Smith RZ, eds. *Introduction to the Electronic Age*. New York: E-Publishing; 2009:281–304.

Journal abbreviations source

Journal names are abbreviated according to Index Medicus.

Video data

Elsevier accepts video material and animation sequences to support and enhance your scientific research. Authors who have video or animation files that they wish to submit with their article are strongly encouraged to include links to these within the body of the article. This can be done in the same way as a figure or table by referring to the video or animation content and noting in the body text where it should be placed. All submitted files should be properly labeled so that they directly relate to the video file's content. In order to ensure that your video or animation material is directly usable, please provide the files in one of our recommended file formats with a preferred maximum size of 150 MB. Video and animation files supplied will be published online in the electronic version of your article in Elsevier Web products, including

ScienceDirect: ➡ <http://www.sciencedirect.com>. Please supply 'stills' with your files: you can choose any frame from the video or animation or make a separate image. These will be used instead of standard icons and will personalize the link to your video data. For more detailed instructions please visit our video instruction pages at ➡ <http://www.elsevier.com/artworkinstructions>. Note: since video and animation cannot be embedded in the print version of the journal, please provide text for both the electronic and the print version for the portions of the article that refer to this content.

AudioSlides

The journal encourages authors to create an AudioSlides presentation with their published article. AudioSlides are brief, webinar-style presentations that are shown next to the online article on ScienceDirect. This gives authors the opportunity to summarize their research in their own words and to help readers understand what the paper is about. More information and examples are available at ➡ <http://www.elsevier.com/audioslides>. Authors of this journal will automatically receive an invitation e-mail to create an AudioSlides presentation after acceptance of their paper.

Supplementary material

Elsevier accepts electronic supplementary material to support and enhance your scientific research. Supplementary files offer the author additional possibilities to publish supporting applications, high-resolution images, background datasets, sound clips and more. Supplementary files supplied will be published online alongside the electronic version of your article in Elsevier Web products, including ScienceDirect: <http://www.sciencedirect.com>. In order to ensure that your submitted material is directly usable, please provide the data in one of our recommended file formats. Authors should submit the material in electronic format together with the article and supply a concise and descriptive caption for each file. For more detailed instructions please visit our artwork instruction pages at <http://www.elsevier.com/artworkinstructions>.

Database linking

Elsevier encourages authors to connect articles with external databases, giving readers access to relevant databases that help to build a better understanding of the described research. Please refer to relevant database identifiers using the following format in your article: Database: xxxx (e.g., TAIR: AT1G01020; CCDC: 734053; PDB: 1XFN). See <http://www.elsevier.com/databaselinking> for more information and a full list of supported databases.

Submission checklist

The following list will be useful during the final checking of an article prior to sending it to the journal for review. Please consult this Guide for Authors for further details of any item.

Ensure that the following items are present:

One author has been designated as the corresponding author with contact details:

- E-mail address
- Full postal address

All necessary files have been uploaded, and contain:

- Keywords
- All figure captions
- All tables (including title, description, footnotes)

Further considerations

- Manuscript has been 'spell-checked' and 'grammar-checked'
- References are in the correct format for this journal
- All references mentioned in the Reference list are cited in the text, and vice versa
- Permission has been obtained for use of copyrighted material from other sources (including the Internet)

Printed version of figures (if applicable) in color or black-and-white

- Indicate clearly whether or not color or black-and-white in print is required.
- For reproduction in black-and-white, please supply black-and-white versions of the figures for printing purposes.

For any further information please visit our customer support site at <http://support.elsevier.com>.



After Acceptance

Use of the Digital Object Identifier

The Digital Object Identifier (DOI) may be used to cite and link to electronic documents. The DOI consists of a unique alpha-numeric character string which is assigned to a document by the publisher upon the initial electronic publication. The assigned DOI never changes. Therefore, it is an ideal medium for citing a document, particularly 'Articles in press' because they have not yet received their full bibliographic information. Example of a correctly given DOI (in URL format; here an article in the journal *Physics Letters B*):

☞ <http://dx.doi.org/10.1016/j.physletb.2010.09.059>

When you use a DOI to create links to documents on the web, the DOIs are guaranteed never to change.

Proofs

One set of page proofs (as PDF files) will be sent by e-mail to the corresponding author (if we do not have an e-mail address then paper proofs will be sent by post) or, a link will be provided in the e-mail so that authors can download the files themselves.

Elsevier now provides authors with PDF proofs which can be annotated; for this you will need to download Adobe Reader version 7 (or higher) available free from ☞ <http://get.adobe.com/reader>. Instructions on how to annotate PDF files will accompany the proofs (also given online). The exact system requirements are given at the Adobe site: ☞ <http://www.adobe.com/products/reader/tech-specs.html>.

If you do not wish to use the PDF annotations function, you may list the corrections (including replies to the Query Form) and return them to the Journal Manager at Elsevier in an e-mail. Please list your corrections quoting line number. If, for any reason, this is not possible, then mark the corrections and any other comments (including replies to the Query Form) on a printout of your proof and return by fax. Please use this proof only for checking the typesetting, editing, completeness and correctness of the text, tables and figures. Significant changes to the article as accepted for publication will only be considered at this stage with permission from the Editor. We will do everything possible to get your article published quickly and accurately – please let us have all your corrections within 48 hours. It is important to ensure that all corrections are sent back to us in one communication: please check carefully before replying, as inclusion of any subsequent corrections cannot be guaranteed. Proofreading is solely your responsibility. Note that Elsevier may proceed with the publication of your article if no response is received.

Offprints

The corresponding author, at no cost, will be provided with a personalized link providing 50 days free access to the final published version of the article on [ScienceDirect](#). This link can also be used for sharing via email and social networks. For an extra charge, paper offprints can be ordered via the offprint order form which is sent once the article is accepted for publication. Both corresponding and co-authors may order offprints at any time via Elsevier's WebShop (☞ <http://webshop.elsevier.com/myarticleservices/offprints>). Authors requiring printed copies of multiple articles may use Elsevier WebShop's 'Create Your Own Book' service to collate multiple articles within a single cover