



UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARÁ
INSTITUTO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
FACULDADE DE ODONTOLOGIA

THAIS ADRIANE AMARO LOBATO

**ANÁLISE COMPARATIVA DA CITOTOXICIDADE DE ENXAGUANTES
BUCAIS**

BELÉM

2018

THAIS ADRIANE AMARO LOBATO

**ANÁLISE COMPARATIVA DA CITOTOXICIDADE DE ENXAGUANTES
BUCAIS**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado à
Faculdade de Odontologia da Universidade Federal
do Pará, como requisito parcial para obtenção do
grau de Cirurgiã-Dentista.

Orientadora: Profa Dra. Danielle Tupinambá Emmi

BELÉM

2018

THAIS ADRIANE AMARO LOBATO

ANÁLISE COMPARATIVA DA CITOTOXICIDADE DE ENXAGUANTES

BUCAIS

Data de Defesa: ____/____/____

Julgamento: _____

Banca Examinadora:

Profª Dra. Danielle Tupinambá Emmi – Orientadora
Faculdade de Odontologia - UFPA

Profª Dra. Maria Sueli da Silva Kataoka - Examinadora
Faculdade de Odontologia - UFPA

Profª Dra. Roberta Souza D' Almeida Couto – Examinadora
Faculdade de Odontologia - UFPA

Profª Dra. Regina Fátima Feio Barroso - Suplente
Faculdade de Odontologia - UFPA

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente, a Deus, pela vida, por estar sempre no meu caminho, iluminando e guiando as minhas escolhas, e por me dar equilíbrio e paciência para que compreendesse que tudo tem o tempo certo para acontecer.

À minha mãe Luzia, agradeço pela inteira dedicação e por muitas vezes ter deixado de lado seus sonhos para acreditar nos meus. Você é a responsável por essa conquista, e eu a amo muito.

Ao meu pai, Guilherme, pelo carinho, confiança e respeito às minhas escolhas, por me compreender e apoiar.

À minha irmã Talita, sou muito grata por tudo o que você tem feito por mim, tu és um exemplo a ser espelhado pela inteligência, determinação, profissionalismo, te admiro muito.

Obrigada por serem a minha base e estarem ao meu lado, não medindo esforços para me ajudar a alcançar essa conquista, por sempre estarem me apoiando, aconselhando tanto nos momentos fáceis, quanto nos difíceis, esses conselhos me guiaram e continuarão a me guiar por toda a minha vida. Obrigada por serem o meu escudo, em que muitas vezes desabafei as minhas frustrações, por me corrigirem quando necessário, por entenderem os meus momentos de “crise” respeitando meus sentimentos e enxugando minhas lágrimas, me reerguendo através de todo apoio incondicional sempre com paciência, carinho e amor, obrigada por me proporcionarem tudo isso.

À minha irmã Michele e sobrinhos Thiago, Guilherme e Amanda, mesmo distantes, pela força e carinho.

À minha família, vovó Terezinha, tia Tereza, tia Maria, tio Paulo e primos, obrigada pela atenção e apoio durante essa minha trajetória.

Tio Rui (*in memorian*) obrigada por torcer por mim mesmo antes de tudo se tornar realidade, muitas saudades.

Às minhas amigas Rosilene e Marcely obrigada por torcerem e rezarem por mim e estarem ao meu lado sempre.

Às minhas amigas de graduação, pelo convívio e amizade, compreensão e estudos, Géssica Rafaela, Sara, e em especial à Luciane, que foi fundamental para o desenvolvimento deste trabalho .

À minha turma, fundamentais para o meu crescimento profissional e pessoal, vocês são maravilhosos.

À orientadora Dra Danielle Emmi muito obrigada pelo apoio desde o início, paciência, incentivo, carinho e ajuda na construção desse trabalho.

Ao Laboratório de Cultivo Celular da Faculdade de Odontologia (UFPA), que me acolheu e a toda equipe que foram fundamentais para a realização deste trabalho, em especial à Profa. Dra. Maria Sueli Kataoka, por compartilhar este espaço de conhecimento, e à discente Giordanna Chemelo, por dedicar-me seu tempo para enriquecer minha prática sobre o trabalho desenvolvido.

Enfim a todas as pessoas que me ajudaram, não poderia deixar de expressar a minha imensa gratidão.

SUMÁRIO

Artigo elaborado de acordo com as normas da **Revista de Odontologia da UNESP**

RESUMO	2
ABSTRACT	3
INTRODUÇÃO	4
MATERIAL E MÉTODOS	5
RESULTADOS	9
DISCUSSÃO	9
CONCLUSÃO	13
REFERÊNCIAS	14
QUADRO E FIGURA	19
ANEXO	21

**ANÁLISE COMPARATIVA DA CITOTOXICIDADE DE ENXAGUANTES
BUCAIS**

COMPARATIVE ANALYSIS OF MOUTHWASH CYTOTOXICITY

Thais Adriane Amaro LOBATO¹, Danielle Tupinambá EMMI².

¹Discente, thais.lobato05@gmail.com; ²Doutora em Odontologia. Professora Adjunto, dtemmi@ufpa.br. Faculdade de Odontologia da Universidade Federal do Pará - UFPA, Belém, PA,

Autor correspondente:

Danielle Tupinambá Emmi

Endereço: Faculdade de Odontologia da Universidade Federal do Pará – Rua Augusto Corrêa, 01 – Cidade Universitária José da Silveira Netto. CEP: 66075-110. Belém-Pará-Brasil.

E-mail: dtemmi@ufpa.br

RESUMO

Introdução: A incorporação de produtos naturais aos artigos de higiene oral, apresentam benefícios, como a atividade antimicrobiana, além da redução de efeitos colaterais. Porém, antes que esses produtos cheguem ao mercado, se faz necessária a execução de testes laboratoriais que analisem possíveis alterações que possam causar reações adversas nos indivíduos. **Objetivo:** Avaliar comparativamente o potencial citotóxico *in vitro* de enxaguantes bucais disponíveis no mercado e de enxaguantes experimentais com óleos vegetais amazônicos. **Material e método:** Para o ensaio, fibroblastos de ligamento periodontal humano, semeados na concentração de 1×10^4 células/poço, foram expostos por 1 minutos às soluções testes contendo 200 μ L dos enxaguantes bucais formulados com a associação de óleos vegetais de *Astrocaryum vulgare* e *Bactris gasipae* nas concentrações de 5% e 10% e enxaguantes bucais comerciais. Como controle, utilizou-se meio de cultura. A citotoxicidade foi avaliada pelo teste do metiltetrazólio e a contagem realizada no leitor de absorbância Elisa. O teste foi realizado em triplicata e os dados analisados com o teste ANOVA seguido de Tukey ($\alpha=0,05$). **Resultado:** Os enxaguantes bucais comerciais mostraram semelhança estatística ($p>0,05$) e alta citotoxicidade (32 – 38% de viabilidade celular). Já os enxaguantes experimentais apresentaram 60 – 75% de fibroblastos viáveis, não havendo diferença entre as concentrações avaliadas e o controle ($p>0,05$). **Conclusão:** Os produtos experimentais desenvolvidos com os óleos vegetais mostraram-se menos danosos às células quando comparados aos produtos comerciais, podendo ser uma alternativa para o controle do biofilme dental, com menor risco de efeitos adversos.

Descritores: Citotoxicidade; biofilme; óleo vegetal.

ABSTRACT

Introduction: The incorporation of natural products into oral hygiene articles have benefits, such as antimicrobial activity, as well as the reduction of side effects. However, before these products reach the market, it is necessary to perform laboratory tests that analyze possible changes that may cause adverse reactions in individuals. **Objective:** To evaluate comparatively the in vitro cytotoxic potential of mouthwashes available on the market and experimental rinses with Amazonian vegetable oils. **Material and method:** For the test, human periodontal ligament fibroblasts, seeded at a concentration of 1×10^4 cells / well, were exposed for 1 minute to test solutions containing 200 μ L of mouthwashes formulated with the association of vegetable oils of *Astrocaryum vulgare* and *Bactris gasipae* concentrations of 5% and 10% and commercial mouthwashes. As a control, culture medium was used. Cytotoxicity was assessed by the methyltetrazolium test and the count performed on the Elisa absorbance reader. The test was performed in triplicate and the data analyzed with the ANOVA test followed by Tukey ($\alpha = 0.05$). **Results:** Commercial mouthwashes showed statistical similarity ($p > 0.05$) and high cytotoxicity (32-38% of cell viability). Experimental mouthwashes presented 60-75% of viable fibroblasts, with no difference between the concentrations evaluated and the control ($p > 0.05$). **Conclusion:** The experimental products developed with vegetable oils were less harmful to cells when compared to commercial products, and could be an alternative for the control of dental biofilm, with a lower risk of adverse effects.

Descriptors: Cytotoxicity; biofilm; vegetable oil.

INTRODUÇÃO

A cavidade bucal é permeada por uma microbiota específica e complexa que se adere aos tecidos moles e duros, variando de acordo com a superfície colonizada, devido aos fatores biológicos e físicos necessários para a sobrevivência desses microrganismos.¹ Essa microflora residente, mantém uma relação de simbiose com o hospedeiro, promovendo um equilíbrio entre as espécies existentes e impedindo a instalação de espécies patogênicas, auxiliando na preservação da saúde do hospedeiro.²

As principais doenças bucais, tais como a cárie dentária, gengivite e periodontite, têm como principal fator etiológico, o biofilme oral e sua deficiente remoção nos estágios iniciais de formação.³ Desta forma, suprimir e evitar o acúmulo de biofilme é essencial para a prevenção dessas doenças bucais, e a maneira mais eficiente é por meio do controle mecânico, porém esse método sozinho pode não ser totalmente eficaz, pois depende da habilidade e destreza manual dos indivíduos para realização da escovação dentária e limpeza interdental de qualidade.^{4,5} Por conta disso, uso de enxaguantes bucais tornou-se largamente utilizado, pois os mesmos atuam como auxiliar na complementação da higiene bucal, por agirem sobre os microrganismos patogênicos, dificultando a adesão e proliferação desses microrganismos nas superfícies orais, e a ação de suas enzimas.⁶

Atualmente, o mercado odontológico apresenta ampla variedade de enxaguantes bucais, com diferentes ingredientes e princípios ativos em sua composição. Reações tóxicas, inflamatórias, alérgicas, mutagênicas e o desequilíbrio da microbiota são possíveis reações frente a essas diferentes substâncias. Dessa forma, é importante avaliar a resposta biológica e o potencial lesivo que causa danos às células ou tecidos, para que a população tenha acesso a produtos atóxicos, seguros e biocompatíveis⁷.

Neste contexto, pesquisadores tem buscado diversas fontes naturais como alternativas aos tratamentos convencionais, para manutenção da saúde oral. E, a elaboração de novos produtos de higiene bucal, com agentes naturais presentes na formulação tem crescido nos últimos anos, devido estes apresentarem maior biocompatibilidade, baixa toxicidade e risco reduzido de resistência bacteriana.⁸

A floresta amazônica é considerada a maior reserva de plantas medicinais do mundo, com grande capacidade para o desenvolvimento de novos medicamentos.⁹ Dentro desta diversidade amazônica, estão as espécies *Bactris gasipae* e *Astrocaryum vulgare*, que produzem frutos oleaginosos os quais têm sido alvo de pesquisas nos últimos anos.^{8,10,11} Estudo que testou a efetividade dos óleos extraídos dos frutos do tucumã e da pupunha na prevenção à carie dental⁸, observou que ambos reduziram a agregação bacteriana e a perda mineral do esmalte, sendo alternativa viável ao desenvolvimento de produtos destinado à higiene oral. Isso possibilitou a elaboração de um enxaguante bucal, cujos óleos associados constituem-se como o princípio ativo do produto.

Diversos estudos tem chamado a atenção para a relevância de se verificar o grau de citotoxicidade dos materiais odontológicos, considerando este um passo importante antes de sua aplicação na cavidade bucal.^{9,12} Dessa forma, o objetivo deste estudo é avaliar comparativamente o potencial citotóxico *in vitro* de enxaguantes bucais disponíveis no mercado e de enxaguantes experimentais com óleos vegetais amazônicos.

MATERIAIS E MÉTODOS

Enxaguante bucal experimental

Os enxaguantes bucais foram produzidos nas concentrações de 5% e 10% dos óleos de *Astrocaryum vulgare* e *Bactris gasipae* associados, com formulação base

adaptada de Cordeiro et al.¹³ e Zanin et al.¹⁴, sendo elaborados no Laboratório de Pesquisa e Desenvolvimento Farmacêutico e Cosmético da Faculdade de Farmácia da UFPA.

Enxaguantes comerciais

Os produtos comerciais utilizados para os testes comparativos foram adquiridos em farmácias locais, levando-se em consideração diferentes princípios ativos (Clorexidine, Oral-B Complete e Sanifill Cuidado Total) e semelhança nos constituintes da formulação aos enxaguantes experimentais. Nenhum dos produtos testados apresentava álcool em sua composição (Quadro 1).

Cultivo Celular

As análises foram realizadas no Laboratório de Cultivo Celular da Faculdade de Odontologia da Universidade Federal do Pará, sendo utilizados linhagem de fibroblastos derivados de ligamento periodontal humano (FLP), que são importantes para manutenção da gengiva saudável e tecidos adjacentes e utilizadas para testes de citotoxicidade com enxaguantes.¹⁵ As células foram cedidas pelo laboratório e estavam mantidas sob congelamento (-196°C) em nitrogênio líquido e criotubos, acrescido de 1 mL de meio Dulbecco's Modified Eagle Medium: Nutrient Mixture F-12/ DMEM/F12 (Gibco - Grand Island, Nova York, USA).

As células foram retiradas do nitrogênio e colocadas em banho maria a 37°C. Em seguida foram transferidas para um tubo de Falcon e foi acrescentada uma solução preparada com alíquota com 5mL de meio DMEM/F-12 suplementado com 20% de Soro Fetal Bovino – SFB (Gibco - Itapevi, São Paulo, Brasil) totalizando 6 ml. Esse material foi centrifugado a 3000 rotações por minuto (rpm) durante 3 minutos. O sobrenadante foi descartado e o precipitado de células (pellet) resultante da centrifugação, foi

ressuspendido em 2mL de meio DMEM/F-12 suplementado com SFB (20%) e transferido para uma garrafa de cultivo de 25cm², sendo adicionado 3mL de meio, mantida em incubadora de células (Thermo Scientific - Marietta, Ohio, USA) a 37°C em atmosfera úmida foram mantidas em incubadora a 37°C em atmosfera úmida e 5% de dióxido de carbono CO₂, para que ocorresse a adesão e proliferação celular.

Foi realizado o repique para mudança da garrafa pequena, para uma de tamanho médio com 75cm². Primeiro removeu-se o meio saturado, depois foi feita lavagem com solução Phosphate Buffered Saline (PBS), e adição de tripsina – Trypsin/EDTA a 0,25% (Gibco - Grand Island, Nova York, USA), para que as células fossem separadas, posteriormente foi acrescentado meio com soro para bloqueio da tripsina e transferência para um tubo para centrifugação nos mesmos parâmetros já explicitados anteriormente. O precipitado foi ressuspenso em 2mL de DMEM/F12 suplementado com SFB (20%) e realizada a ressuspensão para homogeneização, acrescentando-se mais 5mL de meio para transferência para a garrafa de cultivo média. As culturas foram mantidas em incubadora a 37°C com 5% de CO₂ até que ocorresse a proliferação celular em toda superfície da nova garrafa (confluência), e obtenção da confluência, em torno de 80% a 90%, totalizando assim uma semana do cultivo para as duas garrafas.

Teste de Viabilidade Celular – Ensaio de Metiltetrazólio (MTT)

O ensaio de MTT é um teste colorimétrico utilizado para avaliar a viabilidade celular por meio da atividade enzimática mitocondrial. O MTT (3-(4,5- dimethylthiazol-2-yl) -2,5-diphenyl tetrazolium bromide) é um sal de tetrazolium solúvel em água, de coloração amarelada, que é reduzido por células viáveis em um produto violeta insolúvel em solução aquosa. Este sal amarelo, é clivado por uma enzima mitocondrial, a desidrogenase succínica, dando origem aos cristais de formazan insolúveis, de coloração

violeta. Logo, apenas as células vivas, com atividade mitocondrial normal têm a capacidade de clivar o sal amarelo e de reduzi-lo ao produto violeta. Para que seja possível a leitura do resultado, o produto violeta insolúvel em água deve ser dissolvido em solvente específico e a leitura de intensidade de cor da solução é feita em leitor de placas ELISA.¹⁶

Para análise da citotoxicidade, 1×10^4 células/poço foram semeadas em uma placa de cultivo de 24 poços e mantidas em incubadora com 5% de CO₂ à temperatura de 37°C, durante 24 horas, para adesão e proliferação celular. Após esse período, o meio de cultivo foi removido e realizou-se a lavagem do cultivo com Phosphate Buffered Saline (PBS). As células foram então expostas a 200µL dos enxaguantes bucais, durante 1 minuto. O tempo de exposição das células aos produtos levou em consideração as recomendações para uso indicadas pelo fabricante. Completado o tempo de exposição dos fibroblastos aos produtos, as soluções foram removidas e os poços lavados duas vezes com solução PBS para retirada de células mortas e qualquer resto de solução que pudesse alterar a leitura de absorbância.

Para verificação da viabilidade da cultura, foram adicionados 200µL/poço da solução de MTT (Sigma-Aldrich, São Paulo, Brasil) em meio de cultivo e a placa foi incubada durante 3h, ao abrigo de luz. Posteriormente, esta solução foi removida e os cristais de formazan, resultantes da redução do MTT, foram solubilizados com adição de 200µL/poço de Dimethyl Sulfoxide – DMSO (Amresco LCC - Solon, Ohio, USA). A solução foi ressuspendida 3 vezes e transferida para uma placa de 96 poços. Em seguida a placa foi levada ao leitor ELISA (iMark – Microplate Reader – Bio-Rad, Hercules, Califórnia, USA) para quantificação fotométrica da absorbância, sendo adotado o filtro de medição de 595nm. Dois ensaios independentes foram realizados, cada um deles em triplicata. Todo o experimento foi realizado em ambiente estéril em fluxo laminar, ao abrigo de luz para que não ocorresse alteração do MTT.

Análise de dados

Os dados obtidos dos ensaios de citotoxicidade, para cada um dos produtos testados, foram tabulados e submetidos à análise estatística no programa BioEstat versão 5.5. Foi calculada a média e desvio padrão das avaliações e aplicado o teste ANOVA seguido de Tukey para analisar as diferenças entre os produtos testados, sendo adotado o nível de significância de 5%. Os parâmetros e classificação da citotoxicidade foram: >90%= não apresenta citotoxicidade; 60-89% = baixa citotoxicidade e <59%= alta citotoxicidade.¹⁷

RESULTADOS

Os enxaguantes experimentais (Enx 5% e Enx 10%) apresentaram baixa citotoxicidade, com viabilidade celular em torno de 60-75%. O enxaguante com 10% dos óleos vegetais apresentou taxa de 75% de fibroblastos viáveis revelando-se semelhante ao enxaguante com 5% e ao controle utilizado ($p>0,05$). Os enxaguantes comerciais disponíveis no mercado apresentaram alta citotoxicidade, com 32-38% de viabilidade celular, sendo semelhantes entre si ($p>0,05$) (Figura 1).

DISCUSSÃO

Os resultados deste estudo mostraram que os enxaguantes com óleos de *Astrocaryum vulgare* e *Bactris gasipae* em sua composição, apresentaram as maiores taxas de viabilidade celular quando comparados aos enxaguantes comerciais avaliados ($p=0,0038$). Os produtos experimentais tinham composição similar aos comerciais, podendo-se constatar, com os resultados obtidos, que a quantidade de óleo vegetal presente no produto foi diretamente proporcional ao aumento da taxa de viabilidade

celular, quando comparado aos produtos disponíveis no mercado (Figura 1). Desta forma observou-se que o enxaguante com 10% de óleo apresentou maior número de fibroblastos viáveis do que o produto com 5% de óleo.

Nota-se com mais frequência, a preocupação do consumidor em fazer uso de produtos menos agressivos, tendo assim, intensificado a busca por produtos de origem natural ou o mais próximo dessa.¹⁸ Neste contexto, a análise da citotoxicidade é essencial, para evitar possíveis interferências deletérias nos tecidos orais, ocasionadas por substâncias citotóxicas que compõe o produto.¹⁹ Assim, é possível entender o mecanismo biológico e a capacidade lesiva que origina a morte de células do organismo, devido contato com substâncias danosas, sendo um dos primeiros testes para novos produtos.⁹

Nos últimos anos, produtos naturais se tornaram importantes recursos terapêuticos para a saúde bucal, sendo estudados e empregados em enxaguantes bucais para o tratamento de doenças bucais. Ribeiro et al.²⁰ sugerem que o princípio ativo pode ser empregado na terapia de doenças já instaladas, bem como na profilaxia de rotina. Além da vantagem em relação à saúde, devido apresentarem menos efeitos colaterais quando comparados aos produtos sintéticos, os produtos fitoterápicos são economicamente mais viáveis, sendo uma alternativa ao consumidor.¹⁹

Os enxaguantes bucais são constituídos de substâncias ativas, flavorizantes, edulcorantes, conservantes, tensoativos, espessantes, sequestrantes, e outros, como o álcool etílico presente em alguns deles¹⁴. O álcool apresenta função conservante, mas é um composto tóxico e pode afetar o tecido conjuntivo oral assim como, a cicatrização dos tecidos da mucosa e periodontais,²⁰ sendo responsável por efeitos citotóxicos em fibroblastos gengivais.¹ Devido a isso, optou-se por desenvolver um enxaguante bucal com óleos vegetais, sem a presença de álcool em sua formulação. Para que fosse possível a comparação entre produtos neste estudo, também foram escolhidos produtos comerciais

sem álcool, para que esse não interferisse na viabilidade celular avaliada. Estudo realizado por Pithon et al.,²² que comparou enxaguantes com e sem álcool, demonstrou que os enxaguantes com álcool na composição, apresentaram maior citotoxicidade.

Bruno et al.¹⁷ mencionam que não é o princípio ativo que causa baixa viabilidade celular, mas sim, outros componentes da formulação dos enxaguantes bucais, como por exemplo, o lauril sulfato de sódio (LSS). Por conta disso, infere-se que a citotoxicidade encontrada em alguns estudos sobre enxaguantes bucais, mesmo que o produto apresente princípio ativo natural, seja atribuído a um dos componentes da formulação⁹. Neste enfoque, observou-se no presente estudo que, apesar dos enxaguantes comerciais não apresentarem álcool na sua composição e apresentarem diferentes princípios ativos, todos mostraram alta citotoxicidade, com 32-38% de fibroblastos viáveis. Resultados semelhantes foram encontrados no estudo de Oliveira et al.⁶, onde as seis marcas comerciais de enxaguantes bucais avaliados foram citotóxicos para fibroblastos gengivais.

O lauril sulfato de sódio é um detergente aniônico, com atividade antimicrobiana e é largamente utilizado como agente de limpeza sintético em cosméticos e dentifrícios. Porém, o LSS pode causar efeitos adversos, como dermatite na pele, inflamação e descamação da mucosa bucal. Na tentativa de reduzir esses efeitos colaterais do LSS em dentifrícios e enxaguatórios bucais, a indústria o associou ao triclosan que é um agente antimicrobiano de largo espectro, não-iônico e lipossolúvel. No entanto, estudos realizados sobre a citotoxicidade, comprovaram que tanto em associação, quanto isolados, o lauril sulfato de sódio e o triclosan, provocam citotoxicidade em fibroblastos e em células epiteliais.²³

A clorexidina promove efeitos bactericidas e bacteriostáticos sendo muito indicada na odontologia devido sua característica de substantividade, que proporciona o

efeito prolongado da atividade antibacteriana.^{25,26} No entanto, a clorexidina causa efeitos colaterais indesejáveis, se utilizada por mais de duas semanas, como a coloração marrom-escura nos dentes, distúrbios do paladar, sensibilidade da mucosa lingual, formação aumentada de cálculo supragengival e até descoloração de alguns materiais restauradores. Em nível celular, a clorexidina causa efeitos nocivos aos fibroblastos dos tecidos orais podendo alterar a morfologia, viabilidade e a função celular, o que pode resultar em danos potentes aos fibroblastos gengivais, células epiteliais e do ligamento periodontal, interferindo no tratamento e regeneração periodontal.²⁴ Com isso, esta molécula foi relatada como citotóxica, pois apresentou aproximadamente 55% de fibroblastos viáveis.²⁵

O cetilpiridínio é um surfactante catiônico eficaz na prevenção da placa dentária e na redução da gengivite, sendo mencionado por alguns autores ser tão eficaz quanto à clorexidina na redução dos níveis de bactérias. Entretanto, ambos apresentaram citotoxicidade *in vitro* contra queratinócitos humanos e células de fibroblastos.²⁶

O estudo de Tsourounakis et al²⁶ comprovou que a clorexidina, na concentração comercialmente disponível (0,12%), pode ter efeitos tóxicos em fibroblastos gengivais e nos fibroblastos do ligamento periodontal, causando redução da viabilidade celular, de forma dependente da concentração.²⁸

Sabe-se que o tempo de exposição das células aos produtos interfere na viabilidade celular, contudo, este estudo avaliou apenas o tempo de 1 minuto, já que este é o tempo recomendado pelos fabricantes para utilização dos enxaguatórios. Estudos mostram^{6, 22} que quanto maior o tempo de exposição, menor é o número de células viáveis, o que demonstra a importância da indicação profissional adequada do princípio ativo, tempo de aplicação e duração da terapia.

Em relação a insumos naturais acrescentados aos enxaguantes como princípio ativo, diversas partes do vegetal podem ser usadas, como folhas, frutos, sementes ou casca, para obtenção do extrato ou óleo. Em seu estudo, Azzimonti et al.²⁵ mostraram que a avaliação comparativa do óleo essencial de *Juniperus excelsa* com a clorexidina, em fibroblastos gengivais, constatou maior citocompatibilidade do óleo do que com o enxaguante tradicionalmente prescrito²⁵. Neste enfoque, observou-se também que os enxaguantes experimentais contendo óleos vegetais em sua composição apresentaram-se menos citotóxicos do que os enxaguantes comercialmente disponíveis. Acredita-se que esse resultado pode ter ocorrido devido aos componentes bioquímicos presentes nos óleos de *Astrocaryum vulgare* e *Bactris gasipae*, com destaque para os carotenoides que são indispensáveis para a diferenciação celular e bioatividade importante em linhagens celulares.²⁹

CONCLUSÃO

Os enxaguantes bucais produzidos com os óleos de *Astrocaryum vulgare* e *Bactris gasipae* mostraram baixa citotoxicidade em fibroblastos do ligamento periodontal, no tempo de exposição de 1 minuto.

Os enxaguantes disponíveis no mercado e avaliados nesta pesquisa (Clorexidina, Oral-B Complete e Sanifill Cuidado Total) apresentaram alta citotoxicidade, no mesmo tempo de exposição, 1 minuto.

Os produtos experimentais desenvolvidos com os óleos vegetais mostraram-se menos danosos às células quando comparados aos produtos comerciais, podendo ser uma alternativa para o controle do biofilme dental, com menos risco de efeitos adversos.

REFERÊNCIAS

1. Do T, Devine D, Marsh PD. Oral biofilms: molecular analysis, challenges, and prospects in dental diagnostics. *Clinical, Cosmetic and Investigational Dentistry*. 2013;5:11-19. doi:10.2147/CCIDE.S31005.
2. Costalonga M, Herzberg MC. O microbioma bucal e a imunobiologia da doença periodontal e da cárie. *Cartas de imunologia*. 2014;162(200):22-38. doi: 10.1016 / j.imlet.2014.08.017.
3. Fernandez y Mostajo M, Exterkate RAM, Buijs MJ, Crielaard W, Zaura E. Effect of mouthwashes on the composition and metabolic activity of oral biofilms grown in vitro. *Clinical Oral Investig*. 2017;21(4):1221-1230. doi:10.1007/s00784-016-1876-2.
4. Prasad M, Patthi B, Singla A, Gupta R, Jankiram C, Kumar JK, Vashishtha V, Malhi R. The clinical effectiveness of post-brushing rinsing in reducing plaque and gingivitis: a systematic review. *Journal of Clinical and Diagnostic Research*. JCDR. 2016;10(5):ZE01-ZE07.
5. Araujo MWB, Charles CA, Weinsteis RB, McGuire JA, Parikh-Das AM, Du Q, Zhang J, Berlin JA, Gunsolley JC. Meta-analysis of the effect of an essential oil-containing mouthrinse on gingivitis and plaque. *J Am Dent Assoc*. 2015 Aug; 146(8):610-622. doi: 10.1016.
6. Oliveira JR, Belato KK, Oliveira FE, Jorge AOC, Camargo SEA, Oliveira LD. Mouthwashes: an in vitro study of their action on microbial biofilms and cytotoxicity to gingival fibroblastos. *Gen Dent*. 2018 Mar-Apr;66(2):28-34.

7. Sulistyani H, Fujita M, Miyakawa H, Nakazawa F. Effect of roselle calyx extract on in vitro viability and biofilm formation ability of oral pathogenic bacteria. *Asian Pac J Trop Med*. 2016 Feb;9(2):119-124.
8. Emmi DT. Influência dos óleos do tucumã (*Astrocaryum vulgare*) e da pupunha (*Bactris gasipae*) na composição do biofilme dental e dinâmica do processo de cárie em esmalte: um estudo in situ [tese]. São Paulo: Universidade de São Paulo, 2013. 96p.
9. Marreiro RO, Bandeira MFL, Almeida MCA, Coelho CN, Venâncio GN, Conde NCO. Avaliação da citotoxicidade de um enxaguatório bucal contendo extrato de *Libidibia férrea*. *Pesq Bras Odontop Clin Integ*. 2014;14(Supl.3):34-42.
10. Araujo ML, Silva CFC, Filho ALM, Souza RM, Oliveira WS. Atividade antimicrobiana do óleo de duas espécies (*Bactris gasipaes* Kunth e *Bactris dahlgreniana*) de pupunha frente ao crescimento de *S. aureus*. *Ensaio Cienc., Cienc. Biol. Agrar. Saúde*. 2012;16(3):21-27.
11. Jobim ML, Santos RCV, Alves CPS, Oliveira RM, Mostardeiro CP, Sargrillo MR, Filho OCS, Garcia LF, Cattani MFM, Ribeiro EE, da Cruz IB. Antimicrobial activity of amazon *astrocaryum anucleatum* extracts and its association to oxidative metabolism. *Microbiol Res*. 2014;169(4):314-323.
12. Costa CA, Oliveira MF, Giro EM, Hebling J. Biocompatibility of resin-based materials used as pulp-capping agents. *Int Endod J*. 2003;36(12):831-839.
13. Cordeiro CHG, Sacramento LVS, Corrêa MA, Pizzolitto AC, Bauab TM. Análise farmacognóstica e atividade antibacteriana de extratos vegetais empregados em formulação para a higiene bucal. *Rev Bras Ciênc Farmac*. 2006; 42(3):396-404.

14. Zanin SMW, Miguel MD, Barreira SMW, Nakashima T, Cury CD, Costa CK. Enxaguatório Bucal: principais ativos e desenvolvimento de fórmula contendo extrato hidroalcoólico de *Salvia Officinalis* L. *Visão Acadêmica*. 2007;8(1):19-24.
15. Shafiee HA, Motamedi MHK, Mina M, Taheri JB, Azimi S, Johaechi K, Yadegari Z, Rasouli HR. Evaluation of cytotoxic effects of Anbarnesa on fibroblast L929: can it be used as a mouthwash? *Anc Sci Life*. 2014 Apr-Jun; 33(4):203-207.
16. Mosmann T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J Immunol Methods*. 1983; 65(1-2):55-63.
17. Bruno M, Taddeo F, Medeiros IS, Boaro LC, Moreira MS, Marques MM, Calheiros FC. Relationship between toothpastes properties and patient-reported discomfort: crossover study. *Clin Oral Invest*. 2016;20(3):485-494.
18. Packer JF, Luz MMS. Método para avaliação e pesquisa da atividade antimicrobiana de produtos de origem natural. *Rev Bras Farmacog*. 2007;17(1): 102-107.
19. Schmidt J, Zyba V, Jung K, Rinke S, Haak R, Mausberg RF, Ziebolz D. Cytotoxic effects of octenidine mouth rinse on human fibroblasts and epithelial cells – an in vitro study. *Drug Chem Toxicol*. 2016;39(3):322-330.
20. Ribeiro ASC, Pinto ATM, Silva DJ, Peixoto ITA. Atividade antimicrobiana de diferentes colutórios fitoterápicos. *Ensaio Cienc., Cienc. Biol. Agrar. Saúde*. 2015;19(4):178-183.

21. Poggi P, Baena RR, Rizzo S, Rota MT. Mouthrinses with alcohol: cytotoxic effects on human gingival fibroblasts in vitro. *J Periodontol.* 2003 May;74(5):623-629.
22. Pithon MM, Santos AM, Freitas LMA, Souza RA, Santos RL, Martins FO, Romanos MTV. Avaliação in vitro da citotoxicidade de enxaguatórios bucais com e sem álcool. *Rev. Cir., Traumatol. Buco-maxilo-fac.* 2011 Jan.-Mar;11(1):93-98.
23. Babich JH, Babich JP. Sodium lauryl sulfate and triclosan: in vitro cytotoxicity studies with gingival cells. *Toxicol Lett.* 1997 May;91(3):189-196.
24. Pucher JJ, Daniel JC. The effects of chlorhexidine digluconate on human fibroblasts in vitro. *J Periodontol* 1992;63(6):526-532.
25. Azzimonti B, Cochis A, Beyrouthy ME, Iriti M, Uberti F, Sorrentino R, Landini MM, Rimondini L, Varoni EM. Essential oil from Berries of Lebanese *Juniperus excelsa* M. Bieb displays similar antibacterial activity to chlorhexidine but higher cytocompatibility with human oral primary cells. *Molecules.* 2015;20(5): 9344-9357.
26. Tsourounakis L, Palaiologou-Gallis AA, Stoute D, Maney P, Lallier TE. Effect of essential oil and chlorhexidine mouthwashes on gingival fibroblast survival and migration. *J Periodontol.* 2013;84(8):1211-1220.
27. Müller HD, Eick S, Moritz A, Lussi A, Gruber R. Cytotoxicity and antimicrobial activity of oral rinse in vitro. *Biomed Res Int.* 2017; 2017:1-9,4019723.
28. Flemingson, Emmadi P, Ambalavanan N, Ramakrishnan T and Vijayalakshmi R. Effect of three commercial mouth rinses on cultured human gingival fibroblast: an in vitro study. *Indian J Dent Res.* 2008 Jan;19(1):29–35.

29. Sagrillo MR, Garcia LF, Filho OCS, Duarte MM, Ribeiro EE, Cadoná FC, Cruz IB. Tucumã fruit extracts (*Astrocaryum aculeatum* Meyer) decrease cytotoxic effects of hydrogenperoxide on human lymphocytes. Food Chem. 2015 Apr; 173:741-748. Doi:10.1016.

QUADRO E FIGURA

Quadro 1: Produtos comerciais utilizados na pesquisa, seus fabricantes e respectivos princípios ativos. Belém (PA), 2018.

Produto	Princípio Ativo	Fabricante
Oral B Complete	Cloreto de cetilpiridínio	Procter & Gamble do Brasil S/A, Rio de Janeiro, RJ, Brasil.
Sanifill Cuidado Total	Triclosan	Cosmed Indústria de Cosméticos e Medicamentos S/A, Barueri, SP, Brasil.
Clorexidine	Clorexidina	Farmácia A Formula, Belém, PA, Brasil.

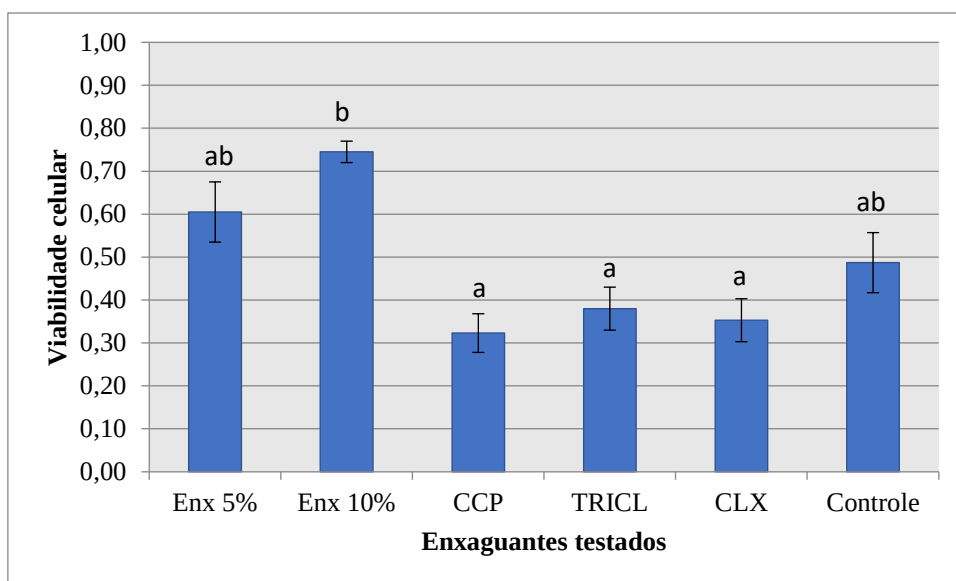


Figura 1: Média e desvio padrão da viabilidade celular ($\lambda=595\text{nm}$) de fibroblastos expostos aos diferentes produtos testados.

Teste ANOVA seguido de Tukey ($\alpha=0,05$). Letras iguais indicam semelhança estatística.

Enx 5%: Enxaguante com 5% de óleos vegetais; **Enx 10%:** Enxaguante com 10% dos óleos vegetais; **CCP:** Cloreto de cetilperidínio; **TRIC:** Triclosan; **CLX:** clorexidina.

ANEXO

Normas da Revista De Odontologia da UNESP

Artigo

O texto, incluindo resumo, abstract, tabelas, figuras e referências, deve estar digitado no formato *.doc*, preparado em *Microsoft Word 2007 ou posterior*, fonte *Times New Roman*, tamanho 12, espaço duplo, margens laterais de 3 cm, superior e inferior com 2,5 cm, e conter um total de 20 laudas. Todas as páginas devem estar numeradas a partir da página de identificação.

Resumo e Abstract

O artigo deve conter RESUMO e ABSTRACT precedendo o texto, com o máximo de 250 palavras, estruturado em seções: introdução; objetivo; material e método; resultado; e conclusão. Nenhuma abreviação ou referência (citação de autores) deve estar presente.

Descritores/Descriptors

Indicar os Descritores/Descriptors com números de 3 a 6, identificando o conteúdo do artigo, e mencioná-los logo após o RESUMO e o ABSTRACT.

Para a seleção dos Descritores/*Descriptors*, os autores devem consultar a lista de assuntos do *MeSH Data Base* (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/mesh>) e os Descritores em Ciências da Saúde – DeCS (<http://decs.bvs.br/>).

Deve-se utilizar ponto e vírgula para separar os descritores/*descriptors*, que devem ter a primeira letra da primeira palavra em letra maiúscula.

Exemplos:

Descritores: Resinas compostas; dureza.
Descriptors: Photoelasticity; passive fit.

Introdução

Explicar precisamente o problema, utilizando literatura pertinente, identificando alguma lacuna que justifique a proposição do estudo. No final da introdução, estabelecer a hipótese a ser avaliada.

Material e método

Apresentar com detalhes suficientes para permitir a confirmação das observações e possibilitar sua reprodução. Incluir cidade, estado e país de todos os fabricantes, depois da primeira citação dos produtos, instrumentos, reagentes ou equipamentos. Métodos já publicados devem ser referenciados, exceto se modificações tiverem sido feitas. No final do capítulo, descrever os métodos estatísticos utilizados.

Resultado

Os resultados devem ser apresentados seguindo a sequência do Material e método, com tabelas, ilustrações, etc. Não repetir no texto todos os dados das tabelas e ilustrações, enfatizando somente as observações importantes. Utilizar o mínimo de tabelas e de ilustrações possível.

Discussão

Discutir os resultados em relação à hipótese testada e à literatura (concordando ou discordando de outros estudos, explicando os resultados diferentes). Destacar os achados do estudo e não repetir dados ou informações citados na introdução ou nos resultados. Relatar as limitações do estudo e sugerir estudos futuros.

Conclusão

A(s) conclusão(ões) deve(m) ser coerentes com o(s) objetivo(s), extraídas do estudo, não repetindo simplesmente os resultados.

Agradecimentos

Agradecimentos às pessoas que tenham contribuído de maneira significativa para o estudo e agências de fomento devem ser realizadas neste momento. Para o(s) auxílio(s) financeiro(s) deve(m) ser citado o(s) nome(s) da(s) organização(ões) de apoio de fomento e o(s) número(s) do(s) processo(s).

Ilustrações e tabelas

As ilustrações, tabelas e quadros são limitadas no máximo de 4 (quatro). As ilustrações (figuras, gráficos, desenhos, etc.), são consideradas no texto como figuras. Devem ser numeradas consecutivamente em algarismos arábicos segundo a ordem em que aparecem no texto e indicadas ao longo do Texto do Manuscrito, logo após sua primeira citação com as respectivas legendas. As figuras devem estar em cores originais, digitalizadas em formato tif, gif ou jpg, com no mínimo 300dpi de resolução, 86 mm (tamanho da coluna) ou 180 mm (tamanho da página inteira).

As legendas correspondentes devem ser claras, e concisas. As tabelas e quadros devem ser organizadas e numeradas consecutivamente em algarismos arábicos segundo a ordem em que aparecem no texto e indicadas ao longo do Texto do Manuscrito, logo após sua primeira citação com as respectivas legendas. A legenda deve ser colocada na parte superior. As notas de rodapé devem ser indicadas por asteriscos e restritas ao mínimo indispensável.

Citação de autores no texto

Os autores devem ser citados no texto em ordem ascendente

A citação dos autores no texto pode ser feita de duas formas:

Numérica: as referências devem ser citadas de forma sobrescrita.

Exemplo: Radiograficamente, é comum observar o padrão de “escada”, caracterizado por uma radiolucidez entre os ápices dos dentes e a borda inferior da mandíbula.^{6,10,11,13}

Alfanumérica:

- um autor: Ginnan⁴
- dois autores: separados por vírgula - Tunga, Bodrumlu¹³
- três autores ou mais de três autores: o primeiro autor seguido da expressão et al. - Shipper et al.²

Exemplo: As técnicas de obturação utilizadas nos estudos abordados não demonstraram ter tido influência sobre os resultados obtidos, segundo Shipper et al.² e Biggs et al.⁵ Shipper et al.², Tunga, Bodrumlu¹³ e Wedding et al.¹⁸, [...]

Referências

Todas as referências devem ser citadas no texto; devem também ser ordenadas e numeradas na mesma sequência em que aparecem no texto. Citar no máximo 25 referências.

As Referências devem seguir os requisitos da National Library of Medicine (disponível em <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK7256/>).

Os títulos dos periódicos devem ser referidos de forma abreviada, sem negrito, itálico ou grifo, de acordo com o Journals Data Base (PubMed) (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nlmcatalog/journals>), e, para os periódicos nacionais, verificar o Portal de Revistas Científicas em Ciências da Saúde da Bireme (<http://portal.revistas.bvs.br/?lang=pt>).

A exatidão das referências constantes da listagem e a correta citação no texto são de responsabilidade do(s) autor(es) do artigo. Citar apenas as referências relevantes ao estudo.

Referências à comunicação pessoal, trabalhos em andamento, artigos in press, resumos, capítulos de livros, dissertações e teses não devem constar da listagem de referências. Quando essenciais, essas citações devem ser registradas por asteriscos no rodapé da página do texto em que são mencionadas.

Exemplos de referências

Artigos de periódicos

Duane B. Conservative periodontal surgery for treatment of intrabony defects is associated with improvements in clinical parameters. *Evid Based Dent.* 2012;13(4):115- 6.

Litonjua LA, Cabanilla LL, Abbott LJ. Plaque formation and marginal gingivitis associated with restorative materials. *Compend Contin Educ Dent.* 2012 Jan;33(1):E6- E10.

Sutej I, Peros K, Benutic A, Capak K, Basic K, Rosin-Grget K. Salivary calcium concentration and periodontal health of young adults in relation to tobacco smoking. *Oral Health Prev Dent.* 2012;10(4):397-403.

Tawil G, Akl FA, Dagher MF, Karam W, Abdallah Hajj Hussein I, Leone A, et al. Prevalence of IL-1beta+3954 and IL-1alpha-889 polymorphisms in the Lebanese population and its association with the severity of adult chronic periodontitis. *J Biol Regul Homeost Agents.* 2012 Oct-Dec;26(4):597-606.

Goyal CR, Klukowska M, Grender JM, Cunningham P, Qaqish J. Evaluation of a new multi-directional power toothbrush versus a marketed sonic toothbrush on plaque and gingivitis efficacy. *Am J Dent.* 2012 Sep;25 Spec No A(A):21A-26A.

Caraivan O, Manolea H, Corlan Pușcu D, Fronie A, Bunget A, Mogoantă L. Microscopic aspects of pulpal changes in patients with chronic marginal periodontitis. *Rom J Morphol Embryol.* 2012;53(3 Suppl):725-9.

Livros

Domitti SS. Prótese total articulada com prótese parcial removível. São Paulo: Santos; 2001.

Todescan R, Silva EEB, Silva OJ. Prótese parcial removível : manual de aulas práticas disciplina I. São Paulo: Santos ; 2001.

Gold MR, Siegal JE, Russell LB, Weintein MC, editors. Cost- effectiveness in health and medicine. Oxford: Oxford University Press; 1997.