



UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
FACULDADE DE FARMÁCIA, ODONTOLOGIA E ENFERMAGEM
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ODONTOLOGIA

GABRIELA DE ALBUQUERQUE ALMEIDA FIGUEREDO

POTENCIAL ANTICÁRIE DE DENTIFRÍCIOS À BASE DE PRODUTOS
NATURAIS – ESTUDO *IN VITRO*

FORTALEZA

2021

GABRIELA DE ALBUQUERQUE ALMEIDA FIGUEREDO

POTENCIAL ANTICÁRIE DE DENTIFRÍCIOS À BASE DE PRODUTOS NATURAIS –
ESTUDO *IN VITRO*

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Odontologia da Faculdade de Farmácia, Odontologia e Enfermagem da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial para a obtenção do Título de Mestre em Odontologia.

Área de concentração: Clínica Odontológica

Orientadora: Profa. Dra. Vanara Florêncio Passos

Coorientador: Prof. Dr. Sérgio Lima Santiago

FORTALEZA

2021

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
Universidade Federal do Ceará
Biblioteca Universitária

Gerada automaticamente pelo módulo Catalog, mediante os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

- F484p Figueredo, Gabriela de Albuquerque Almeida.
Potencial anticárie de dentifrícios à base de produtos naturais – estudo in vitro / Gabriela de Albuquerque Almeida Figueredo. – 2021.
55 f. : il. color.
- Dissertação (mestrado) – Universidade Federal do Ceará, Faculdade de Farmácia, Odontologia e Enfermagem, Programa de Pós-Graduação em Odontologia, Fortaleza, 2021.
Orientação: Prof. Dr. Vanara Florêncio Passos.
Coorientação: Prof. Dr. Sérgio Lima Santiago.
1. Cárie dentária. 2. Dentifrícios. 3. Esmalte dentário. 4. Streptococcus mutans. 5. Fitoterapia. I.
Título.

CDD 617.6

GABRIELA DE ALBUQUERQUE ALMEIDA FIGUEREDO

POTENCIAL ANTICÁRIE DE DENTIFRÍCIOS À BASE DE PRODUTOS NATURAIS –
ESTUDO *IN VITRO*

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Odontologia da Faculdade de Farmácia, Odontologia e Enfermagem da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial para a obtenção do Título de Mestre em Odontologia.

Área de concentração: Clínica Odontológica

Aprovada em: ____/____/____

BANCA EXAMINADORA

Profa. Dra. Vanara Florêncio Passos (Orientadora)
Universidade Federal do Ceará (UFC)

Profa. Dra. Cecília Atem Gonçalves de Araújo Costa
Universidade de Fortaleza (Unifor)

Profa. Dr. Juliano Sartori Mendonça
Universidade Federal do Ceará (UFC)

AGRADECIMENTOS

A **Deus**, que tem abençoado meus sonhos e me ajudado a torná-los realidade. Ele é meu companheiro de todas as horas, a minha fortaleza e o meu refúgio.

À minha família, especialmente aos meus queridos pais: **Antônio**, *in memoriam*, nunca me esquecerei de sua inteligência, suas aulas de reforço de Matemática, sua organização exemplar; e à minha mãe, **Mônica**, forte colaboradora, exemplo de mulher batalhadora, tão presente, avó dedicada e querida, sempre disposta a me ajudar e desejosa de contemplar minhas realizações. Às minhas irmãs **Monalisa** e **Camila**, tias maravilhosas para minhas filhas, amigas e verdadeiros exemplos de determinação.

À minha sogra, **Rita**, *in memoriam*, por ter sido referência de mãe e de esposa, pelo excelente caráter deixado a seus três filhos, juntamente ao seu esposo, **Joaquim**, sempre tão acolhedores e avós dedicados. Ao meu sogro **José Furtado** e à sua esposa **Rosa**, pela atenção e pelo carinho com a família. Aos meus cunhados **Fábio**, **Leudo Júnior**, **Leonardo**, **Alfredo** e **Débora**, gratidão pela amizade e pelo apoio de sempre.

Ao meu esposo e melhor amigo **José Fabiano**, pai dedicado, parceiro não só da rotina atribulada, mas também de momentos maravilhosos de crescimento mútuo e de união.

Às minhas filhas **Maria Fernanda** e **Maria Alice**, que me têm feito sentir o indescritível prazer de ser mãe; todos os meus planos sempre as priorizam.

À minha orientadora **Vanara Florêncio Passos**, pela dedicação e paciência, inspiração que tem sido um incentivo ao meu aprendizado.

À professora **Ramille Araújo Lima**, pelo acolhimento e pela disposição em tirar dúvidas e ensinar sempre de uma maneira tão cativante.

Ao professor **Juliano Sartori Mendonça**, por aceitar o convite para compor a banca da minha qualificação e da minha defesa, e por fazer considerações tão válidas para o enriquecimento deste trabalho.

À professora **Cecília Atem Gonçalves**, que tive a satisfação de conhecer ainda durante seu mestrado, a qual tanto me inspirou e encorajou a seguir buscando meu sonho.

Aos professores **Carlos Augusto Fernandes** e **Sérgio Santiago**, os quais, desde a minha graduação, são grandes referências para mim.

Aos técnicos do laboratório: **Manuel Florindo**, pela disposição em ajudar sempre, e **Karine Nojosa**, pela satisfação em auxiliar a todos no laboratório, pelas conversas acolhedoras sobre tantos assuntos.

Aos funcionários da secretaria do PPGO, **Rafael Maia Reis** e **Joana Karla de Assis Pinheiro**, por sempre serem tão solícitos.

Às amigas **Grisielle de Sá** e **Bianca Palhano**, pela amizade desde a especialização, por fazerem parte da minha história e por compartilharem tantos aprendizados da vida comigo.

Aos amigos **Sthefane Feitosa** e **Denis Gonçalves**, pelo apoio com meu projeto de pesquisa, pelas conversas sempre agradáveis nos nossos encontros na faculdade.

À amiga **Larissa Moreira**, a qual tanto me ajudou durante os experimentos.

Às amigas **Isabelly Leal** e **Cibele Rabelo**, presentes que o mestrado me deu, por serem ótimas companhias nos almoços e nas atividades do laboratório e por me lembrarem de que tudo daria certo.

À amiga **Caroline Nágila**, outra grata surpresa do mestrado, pela doçura no falar, pela ajuda e companhia nos experimentos.

Ao colega de equipe **Raul Pitombeira**, por toda a ajuda, e **Yasmin Marques**, pelo tempo de contribuição no laboratório.

Aos amigos **Salma Araújo**, **Ruliglésio Rocha**, **Sussan Salazar**, **Matheus Vieira**, por explicarem as metodologias, sempre tirarem dúvidas, emprestarem material e me ajudarem com enorme boa vontade.

À amiga **Cristiane Tomaz Rocha**, que me encaminhou artigos científicos para ajudar no meu aprendizado, pelo interesse no andamento do meu mestrado e, principalmente, por acreditar que eu seria capaz de conquistar esse título quando eu duvidei.

RESUMO

Dentifrícios comerciais livres de Triclosan (TCS), Lauril Sulfato de Sódio (LSS), parabenos e/ou flúor encontram-se disponíveis no mercado, reportando-se como naturais e com menor risco à saúde. Entretanto, evidencia-se um reduzido número de estudos rigorosos quanto à sua segurança e eficácia. Este trabalho objetivou avaliar a eficácia de alguns dentifrícios naturais comerciais referente à prevenção de cárie. Realizou-se um experimento laboratorial do tipo *in vitro*, randomizado, com 5 grupos experimentais (n= 9) para investigação da eficácia anticárie. Os tratamentos consistiram em: dentifrício com fluoreto de estanho e LSS; dentifrício à base de nim, semente de uva, alcaçuz, erva-doce, cravo e hortelã-pimenta; dentifrício à base de camomila, babosa, nim, hibisco, manjeriço e chá verde; dentifrício à base de melaleuca; sem tratamento (controle negativo - água destilada). Os dentifrícios testados foram analisados quanto ao potencial antibiofilme. Os espécimes de esmalte foram submetidos à formação de biofilme por *Streptococcus mutans* e receberam os tratamentos acima citados, duas vezes ao dia, durante 4 dias. As análises de biofilme foram avaliadas por Unidades Formadoras de Colônia (UFC) e peso seco; as alterações na estrutura do esmalte foram avaliadas por Microdureza Longitudinal (ML), morfologia das superfícies de esmalte por meio da Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) e da Microscopia de Luz Polarizada (MLP). Submeteram-se os dados obtidos aos testes de ANOVA e pós-teste de Tukey, com nível de significância de 5%. Verificou-se que o dentifrício com fluoreto de estanho mostrou menores valores na contagem de UFC e resultados estatisticamente semelhantes ao dentifrício de nim e o de melaleuca quanto ao peso seco de biofilme, sugerindo maior efeito inibitório de biofilme do que o controle negativo e o dentifrício de camomila; na análise de ML, a água destilada e o dentifrício de camomila apresentaram os menores valores nas profundidades de 10 até 100 µm. Nas análises qualitativas, houve semelhança de resultados entre o controle negativo e o grupo tratado com o dentifrício de camomila, ambos com maior perda mineral, e diferenças entre estes e os demais grupos. Com base nos resultados obtidos e dentro das limitações deste estudo, concluiu-se que o dentifrício de fluoreto de estanho teve considerável eficácia no controle de biofilme. Os dentifrícios de nim e de melaleuca apresentaram os resultados de perfil de dureza, MEV e MLP semelhantes ao fluoretado, porém nenhum dos tratamentos impediu o surgimento de lesão de subsuperfície.

Palavras-chave: Cárie dentária. Dentifrícios. Esmalte dentário. *Streptococcus mutans*. Fitoterapia.

ABSTRACT

Commercial dentifrices free of Triclosan (TCS), Sodium Lauryl Sulfate (LSS), parabens and/or fluorine are available, reported as natural and with less risk to health. However, there is a small number of rigorous studies regarding its safety and efficacy. This work aimed to evaluate the effectiveness of some commercial natural dentifrices regarding caries prevention. A randomized *in vitro* laboratory experiment was carried out with 5 experimental groups (n= 9) to investigate the anticaries efficacy. The treatments consisted of: dentifrice with stannous fluoride and LSS; dentifrice based on neem, grape seed, licorice, fennel, cloves and peppermint; toothpaste based on chamomile, aloe, neem, hibiscus, basil and green tea; tea tree toothpaste; without treatment (negative control - distilled water). The tested dentifrices were analyzed for antibiofilm potential. The enamel specimens were submitted to biofilm formation by *Streptococcus mutans* and received the treatments mentioned above, twice a day, for 4 days. Biofilm analyzes were evaluated by Colony Forming Units (CFU) and dry weight; changes in enamel structure were evaluated by Longitudinal Microhardness (LM), morphology of enamel surfaces by Scanning Electron Microscopy (SEM) and Polarized Light Microscopy (PLM). The data obtained were submitted to ANOVA and Tukey's post-test, with a significance level of 5%. It was found that the dentifrice with stannous fluoride showed lower values in the CFU count and statistically similar results to the neem and tea tree dentifrices regarding the dry weight of biofilm, suggesting a greater inhibitory effect of biofilm than the negative control and the dentifrice of chamomile; in the LM analysis, distilled water and chamomile dentifrice showed the lowest values at depths from 10 to 100 μm . In the qualitative analysis, there were similar results between the negative control and the group treated with chamomile toothpaste, both with greater mineral loss, and differences between these and the other groups. Based on the results obtained and within the limitations of this study, it was concluded that the stannous fluoride toothpaste had considerable effectiveness in controlling biofilm. The neem and tea tree dentifrices presented the results of hardness profile, SEM and PLM similar to fluoride, but none of the treatments prevented the appearance of subsurface lesion.

Key words: Dentifrices. Dental Caries. Dental Enamel. *Streptococcus mutans*. Phytotherapy.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	10
2 REFERENCIAL TEÓRICO	13
2.1 Biofilme e Cárie dentária	13
2.2 Dentifrícios	15
3 HIPÓTESE NULA	19
4 OBJETIVOS	20
4.1 Objetivo Geral	20
4.2 Objetivos Específicos	20
5 MATERIAL E MÉTODOS	21
5.1 Aspectos éticos	21
5.2 Delineamento experimental	21
5.3 Preparo dos espécimes de esmalte	21
5.4 Investigação da eficácia anticárie de dentifrícios naturais	25
5.4.1 Formação dos biofilmes in vitro	25
5.4.2 Preparo das soluções e aplicação dos tratamentos.....	26
5.4.3 Análise de biofilme.....	27
5.4.4 Microdureza Longitudinal pós formação de biofilme	28
5.4.5 Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)	28
5.4.6 Análise das regiões de desmineralização em esmalte por meio da Microscopia de Luz Polarizada (MLP)	29
5.5 Análise estatística	29
6 RESULTADOS	30
6.1 Unidades Formadoras de Colônia (UFC) e peso seco	30
6.2 Microdureza Longitudinal Knoop	31
6.3 Microscopia Eletrônica de Varredura	33
6.4 Microscopia de Luz Polarizada	34

7 DISCUSSÃO	36
8 CONCLUSÃO	43
REFERÊNCIAS	44
ANEXO	53

1 INTRODUÇÃO

Ao longo dos séculos, a humanidade tem se beneficiado de substâncias naturais para prevenir e tratar moléstias, como as doenças bucais. Nesse viés, medicamentos fitoterápicos têm sido usados há mais de 2.000 anos com o objetivo de manter a boa higiene oral e prevenir inflamações (PALOMBO, 2011). Desse modo, algumas plantas e outras substâncias de origem natural têm atraído a atenção por estarem sendo incorporadas a produtos para higiene bucal, como enxaguatórios e dentifrícios (CHINSEMBU, 2015). Essas substâncias podem apresentar a capacidade de reduzir as populações da microbiota oral, bem como sua adesão e colonização, sem causar resistência bacteriana nem efeitos adversos (CHINSEMBU, 2015; KOUIDHI; AL QURASHI; CHAIEB, 2015).

A título de ilustração, a cárie dentária é uma doença dependente de biofilme e de consumo de carboidratos fermentáveis para seu início e evolução (PAES LEME *et al.*, 2006; TENUTA; CURY, 2010). Nas últimas 3 décadas, a cárie de dentição decídua não tem apresentado alterações globais significativas (PERES *et al.*, 2019), mas ocupa, dentre as 30 principais afecções, a 5ª posição, mostrando as mais altas taxas de incidência (GBD, 2017). Com relação à dentição permanente, dados dos últimos 6 anos apontam esta como a condição mais comum em todo o mundo (PERES *et al.*, 2019). Uma alteração ecológica no ambiente do biofilme em contato com a superfície dental, ocasionada por acessos frequentes desse biofilme a carboidratos fermentáveis da dieta, conduz a uma modificação de população microbiana de baixo poder cariogênico para uma de alto poder cariogênico, paralelamente a um aumento na produção de ácidos orgânicos (DIBDIN; SHELLIS, 1988), o que promove perda de tecidos dentais mineralizados e resulta em cárie (FEJERSKOV; LARSEN, 2015).

Nesse contexto, diante da existência de doenças bucais como a lesão de cárie dentária, o melhor método para prevenir e reduzir essa doença, bem como a inflamação gengival, é a remoção mecânica do biofilme com escovação aliada ao uso de dentifrícios os quais contenham agentes químicos que possam melhorar sua eficácia e reforçar sua ação antibacteriana (SALIASI *et al.*, 2018). Os dentifrícios, geralmente encontrados em forma de creme ou de gel, idealmente se propõem a aparelhar o ato da escovação, promovendo, durante a remoção de resíduos alimentares do meio bucal, a limpeza, a boa estética e a saúde bucal, auxiliando na prevenção de doenças periodontais e de cárie, por atuarem como veículos para substâncias químicas que podem ser incorporadas às suas diferentes formulações e que podem, além de potencializar a ação de limpeza e de conferir sensação de refrescância, apresentar propriedades antibacterianas, remineralizantes, dessensibilizantes, entre outras (FIORILLO *et al.*, 2020).

Dessa forma, agentes como Triclosan (TCS), Lauril Sulfato de Sódio (LSS) e parabenos foram adicionados aos dentifrícios para reforçar sua ação antibiofilme (CHINSEMBU, 2015; SALIASI *et al.*, 2018). O Triclosan, componente incorporado a uma variedade de produtos de higiene pessoal, inclusive dentifrícios, é um antimicrobiano que apresenta utilização desde 1972 e que possui a capacidade de interromper os processos biológicos (WEATHERLY; GOSSE, 2017). O Lauril Sulfato de Sódio é um surfactante adicionado aos dentifrícios para promover tanto limpeza quanto efeitos antibacterianos (SÄLZER *et al.*, 2016) e a formação de espuma, auxiliando na dispersão do dentifrício no meio bucal (SHIM *et al.*, 2012). Como conservantes, os parabenos são adicionados à composição dos dentifrícios para impedir a contaminação desses produtos por microrganismos após a abertura, uma vez que os dentifrícios, por serem úmidos, conferem um meio favorável ao crescimento bacteriano (PARK *et al.*, 2014).

Ademais, sabe-se que o íon fluoreto é um componente bastante comum dos dentifrícios e inibe o processo cariioso devido ao seu poder de reduzir a desmineralização e potencializar a remineralização das estruturas mineralizadas dos dentes (CURY *et al.*, 2016; CURY; TENUTA, 2009; TENUTA *et al.*, 2008). A literatura aponta a escovação dentária com dentifrícios fluoretados como o único procedimento cujos resultados na redução da cárie dentária são fortemente baseados em evidências científicas claras (MARINHO *et al.*, 2004). Os dentifrícios fluoretados são, contemporaneamente, o método mais amplamente utilizado para manter fluoreto solúvel disponível na cavidade bucal, o que constitui um importante papel na redução de lesões de cárie (CURY *et al.*, 2004; TENUTA; CURY, 2010; VALE *et al.*, 2007). Nesse sentido, o íon fluoreto pode apresentar-se combinado com diferentes íons nas formulações de dentifrícios comerciais, inclusive com íons metálicos, e uma das combinações mais comuns do íon fluoreto, aceita pela ADA (American Dental Association) como clinicamente eficaz, é com o íon estanho (II), formando o fluoreto de estanho (SnF_2); tal combinação tem chamado a atenção pelo seu poder cariostático, explicado pelo potencial antimicrobiano do íon estanho e pela sua alta afinidade por superfícies de apatita, formando uma capa protetora no esmalte dentário, protegendo-o dos ácidos erosivos (FIORILLO *et al.*, 2020; LIPPERT, 2016), além de sua boa substantividade oral, especialmente em biofilmes dentais (SCOTT *et al.*, 2009).

Entretanto, de acordo com alguns estudos, componentes tais como os supracitados podem representar um risco para a saúde humana. A literatura sugere resistência bacteriana ao Triclosan, bem como efeitos tóxicos decorrentes de seu uso e redução de sua eficácia clínica (CHINSEMBU, 2015; WEATHERLY; GOSSE, 2017), além de possíveis efeitos adversos à saúde humana e ao meio ambiente, o que tem levado fabricantes a não mais utilizarem essa

substância na composição de vários produtos de higiene (RANDALL; SEOW; WALSH, 2015). Já o Lauril Sulfato de Sódio, apesar dos benefícios apresentados, pode desencadear efeitos indesejados (HEALY *et al.*, 1999; HOOGENDOORN; SCHOLTERS, 1979; SHIM *et al.*, 2012), induzindo a uma descamação das camadas superficiais de mucina, o que reduz a resistência da mucosa oral (SIEGEL; GORDON, 1986). No caso dos parabenos, existe uma preocupação com as propriedades tóxicas dessas substâncias, como efeitos alergênicos e carcinogênicos (PARK *et al.*, 2014). Em relação ao flúor, há estudos que apontam para uma influência negativa do fluoreto, relacionada, principalmente, à fluorose dentária (WONG *et al.*, 2010; WRIGHT *et al.*, 2014).

Com base nessas propriedades negativas das referidas substâncias, surgiram dentifrícios comerciais livres de Triclosan, Lauril Sulfato de Sódio, parabenos e flúor, contendo substâncias que pudessem substituí-las, como: timol, nim, melaleuca, camomila, chá verde, com a função antiplaca e antibacteriana; óleo de coco sódico, lauril glicosídeo, extrato de *Quillaja saponaria* e sarcosinato de lauroil sódico como surfactantes; babosa como adstringente; benzoato de sódio e sorbato de potássio como conservantes (CHINSEMBU, 2015).

As propriedades antimicrobianas dos dentifrícios e enxaguatórios cujas composições contêm predominantemente substâncias naturais variam bastante; todavia, poucos produtos desse tipo têm sido submetidos a análises padronizadas, conforme evidenciado pelo número ainda reduzido de informações sobre sua segurança e eficácia na literatura (BHAT; HEDGE; RATHEESH, 2014; LEE; ZHANG; LI, 2004), nos quesitos ação antimicrobiana e prevenção à desmineralização do esmalte dentário (BRAGA *et al.*, 2019; FREIRES; ROSALEN, 2016).

Nessa perspectiva, investigações na área têm sido incentivadas devido à pouca quantidade de estudos que avaliem dentifrícios comerciais denominados naturais quanto ao controle de biofilme cariogênico. Considerando que a oferta e o consumo de produtos naturais têm aumentado - estimulados pela filosofia de que o uso de cremes dentais com agentes naturais não gera riscos à saúde e pelos estudos os quais apontam para o íon fluoreto, o Triclosan, o Lauril Sulfato de Sódio e os parabenos como componentes de cremes dentais que apresentam riscos para a saúde humana -, é essencial investigar se realmente há eficácia de alguns dentifrícios comerciais baseados em produtos naturais comerciais no quesito prevenção contra a doença cárie, justificando a relevância deste estudo, que tem como objetivo avaliar a eficácia de dentifrícios naturais comerciais no controle de lesões iniciais de cárie em esmalte humano.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 Biofilme e Cárie dentária

O biofilme formado sobre as superfícies dos dentes, também conhecido como placa dentária, abriga diversas espécies de microrganismos orais acumulados e organizados de forma espacial (MARSH; MARTIN, 2009), desenvolvendo uma comunidade embebida numa matriz de polímeros extracelulares sob condições heterogêneas, onde acontecem interações entre essas múltiplas espécies (HOJO *et al.*, 2009; KARATAN; WATNICK, 2009; KURAMITSU *et al.*, 2007; STOODLEY *et al.*, 2002). Ele tem início quando apenas algumas espécies de microrganismos conseguem aderir à película adquirida, a qual consiste num envoltório formado sobre a superfície dos dentes quase imediatamente após a higiene bucal ou a erupção dentária e se constitui principalmente por moléculas da saliva e pelo fluido crevicular gengival (proteínas e glicoproteínas) e até mesmo das próprias bactérias residentes do meio bucal (HANNIG; HANNIG; ATTIN, 2005). A princípio, a película causa uma mudança na carga da superfície dentária e favorece uma colonização primária de microrganismos, que se mantêm próximos à superfície dentária por meio de ligações fracas e reversíveis (KOLENBRANDER *et al.*, 2010; MARSH, 2010).

As principais bactérias colonizadoras iniciais, com capacidade de tornar as ligações em irreversíveis, são estreptococos como *Streptococcus mitis* e *Streptococcus oralis* (MARSH, 2010), os quais, por meio de adesinas, ligam-se a receptores existentes na película adquirida; a partir daí, essa mudança de ligação propicia o aumento das populações das espécies pioneiras (MARSH, 2010; WHITTAKER; KLIER; KOLENBRANDER, 1996), e seu metabolismo, devido ao consumo de oxigênio, torna o ambiente progressivamente mais anaeróbico (MARSH, 2010). As bactérias aderidas à superfície dental produzem a matriz da placa bacteriana, formada por polímeros extracelulares (PEC), que têm o poder de ligar, reter e interferir na penetração de moléculas no ecossistema do biofilme (ALLISON, 2003; VU *et al.*, 2009), armazenar água e nutrientes, proteger microrganismos da placa contra as respostas imunes do hospedeiro e contra agentes antimicrobianos (KOLENBRANDER *et al.*, 2010; MARSH, 2010).

As espécies de um biofilme tendem a chegar a uma estabilidade ou a um equilíbrio com o passar do tempo, o que se chama homeostase microbiana, refletindo um estado de dinamismo contínuo marcado por interações entre as espécies que compõem aquela comunidade, e, a menos que haja alguma mudança marcante no ambiente bucal, a comunidade permanece estável (MARSH, 1989). Porém, na presença de uma mudança significativa, o equilíbrio pode ser

quebrado e favorecer o surgimento e desenvolvimento de alguma doença na cavidade bucal (BOWEN, 2015; MARSH, 2010), por exemplo, a cárie dentária.

Nesse contexto, a cárie é uma doença açúcar-biofilme dependente, que acontece devido à estagnação de biofilme na superfície dentária e à progressiva destruição dos tecidos dentais mineralizados cobertos pela placa como resultado de uma alteração no ambiente ecológico e na atividade metabólica da placa bacteriana, devido à constância de uma dieta rica em carboidratos fermentáveis (TENUTA; CURY, 2010). Os carboidratos da dieta são utilizados pelos microrganismos do biofilme para produzir ácidos os quais provocam a perda de minerais dos tecidos duros dos dentes; se a sacarose, carboidrato mais cariogênico da dieta, for utilizada, as bactérias do biofilme podem também sintetizar polissacarídeos intracelulares e extracelulares que aumentam a cariogenicidade do biofilme (BOWEN, 2002; DIBDIN; SHELLIS, 1988; NEWBRUN, 1967; VAN HOUTE; RUSSO; PROSTAK, 1989). Aliado a isso, os microrganismos de alta cariogenicidade, capazes de sobreviver em meio ácido, produzem mais ácido e provocam um desequilíbrio entre os processos de desmineralização e remineralização (DES-RE), o que conduz à perda progressiva de minerais pelas estruturas mineralizadas dos dentes e inicia a lesão de cárie detectável clinicamente (TEN CATE *et al.*, 2011).

Já a bactéria *Streptococcus mutans* é um patógeno Gram-positivo oral que está eminentemente envolvido em processos cariogênicos como organismo pioneiro (CONRADS; ABOUT, 2018), tem potenciais acidogênico (habilidade de transportar e metabolizar uma grande variedade de carboidratos em ácidos orgânicos) e acidúrico (capacidade de se desenvolver em condições de baixo pH) e, a partir da sacarose, sintetiza o glucano, um polímero extracelular que atua promovendo a fixação permanente desse microrganismo em tecidos duros e o desenvolvimento da matriz polimérica extracelular (BOWEN; KOO, 2011; ZENG; BURNE, 2013); além de contribuir, assim, para que outros microrganismos acidogênicos e acidúricos possam se desenvolver no biofilme (LE MOS; BURNE, 2008; LEMOS *et al.*, 2019).

Nesse viés, o biofilme bacteriano na superfície dental sintetiza os ácidos, que se difundem entre os prismas do esmalte dental e para o interior deles, promovendo dissolução de minerais e liberação de íons, como hidrogênio, fosfato e cálcio, induzindo à formação de uma lesão de subsuperfície ou de mancha branca, que, a princípio, possui superfície aparentemente intacta (FEATHERSTONE, 2000). A lesão de mancha branca é a primeira manifestação clinicamente detectável da cárie em esmalte e antecede a cavitação; seu aspecto esbranquiçado e opaco deve-se à alteração do índice de refração que o esmalte originalmente translúcido sofre com a perda de minerais e, conseqüentemente, com o aumento em sua porosidade (FEATHERSTONE, 1999; FEJERSKOV; NYVARD; KIDD, 2011). Com uma semana de

estagnação de biofilme sobre o esmalte, nenhuma alteração clínica pode ser detectada; porém, sob o aspecto histológico, a análise com Microscopia de Luz Polarizada (MLP) já apresenta aumento de porosidade a partir de 20 µm de profundidade, em relação à superfície do esmalte (FEJERSKOV; NYVARD; KIDD, 2011). A porosidade do esmalte da subsuperfície gradualmente aumenta mais do que na superfície, de forma que, apenas após 14 dias de estagnação do biofilme, detecta-se clinicamente, com secagem por jato de ar, a lesão de mancha branca e, após 3 a 4 semanas, é possível identificação de mancha branca sem o auxílio de jatos de ar (FEJERSKOV; NYVARD; KIDD, 2011).

2.2 Dentifrícios

A cárie dentária é uma doença bucal evitável, que afeta a qualidade de vida e o bem-estar das pessoas afetadas, desde crianças muito pequenas até adultos, bem como indivíduos em idade mais avançada, e consiste em um problema de saúde pública (PERES *et al.*, 2019).

Nesse sentido, a eliminação do biofilme utilizando meios mecânicos - principalmente a escovação aliada a um dentifrício - evita o acúmulo de placa sobre as superfícies dentais e sobre as gengivas (PANNUTI *et al.*, 2003), mas a observância e a habilidade em realizar uma higiene bucal adequada são, por vezes, deficientes (BHAT; HEDGE; RATHEESH, 2014). Por isso, alguns agentes químicos têm sido incorporados como coadjuvantes aos dentifrícios para permitir redução satisfatória ou eliminação da placa bacteriana (BHAT; HEDGE; RATHEESH, 2014; CURY; TENUTA, 2014; PANNUTI *et al.*, 2003).

À guisa de exemplificação, quando acontece ingestão de açúcar, se houver íon fluoreto livre e solúvel no fluido do biofilme oral ou na saliva, esse íon exerce uma influência positiva e significativa, interferindo no processo cariioso por meio da redução da desmineralização e do aumento da remineralização na superfície dentária coberta por biofilme cariogênico (CURY *et al.*, 2004; DAWES, 1989; TENUTA; CURY, 2010; VALE *et al.*, 2007). Apesar de reduzir a perda mineral pelos tecidos duros dos dentes, isso não interfere nem no acúmulo de biofilme sobre a superfície dental, nem na produção de ácidos pela fermentação de açúcares (TENUTA; CURY, 2010); mas a incorporação do flúor às formulações dos dentifrícios, bem como à água de abastecimento público, torna-se uma forte aliada na manutenção da saúde oral e no controle do risco às lesões cariosas (CURY *et al.*, 2004; CURY; TENUTA, 2014).

Outrossim, o íon fluoreto apresenta-se em diferentes combinações na formulação dos dentifrícios, sendo as combinações com íons metálicos as que têm apresentado efeito significativo na redução de biofilme, como o diamino fluoreto de prata e o fluoreto de estanho (FERNÁNDEZ *et al.*, 2016; GONZÁLEZ-CABEZAS; FERNÁNDEZ, 2018), porém a

primeira combinação apresenta como desvantagem o manchamento escurecido dos tecidos dentais remineralizados (GONZÁLEZ-CABEZAS; FERNÁNDEZ, 2018). Desse modo, a literatura recente tem apontado para o fluoreto de estanho presente nos dentifrícios como um importante componente capaz de inibir a formação de biofilme, além de evitar a desmineralização do esmalte, quando presente em biofilmes cariogênicos (FERNÁNDEZ *et al.*, 2016; GONZÁLEZ-CABEZAS; FERNÁNDEZ, 2018). Também existe a suposição de que o estanho oferece resistência aos ácidos formados no processo cariioso, formando uma barreira de difusão (LIPPERT, 2016); todavia, o mecanismo de ação do fluoreto de estanho ainda não está completamente elucidado, apesar de já haver comprovação da eficácia do fluoreto de estanho presente nos dentifrícios na redução de biofilme (FERNÁNDEZ *et al.*, 2016).

A partir do entendimento de que os dentifrícios podem contar com agentes adjuvantes no controle da doença cárie, alguns agentes antimicrobianos de origem química passaram a ser adicionados à composição dos dentifrícios; contudo, hodiernamente tem aumentado a preferência de consumidores por produtos com ingredientes fitoterápicos destinados à saúde bucal (CHINSEMBU, 2015), por considerarem estes mais seguros do que os dentifrícios com agentes químicos, uma vez que os denominados dentifrícios “naturais” geralmente não contam com uma série de produtos sintéticos e reduzem as populações da microbiota oral, bem como sua adesão e colonização (CHINSEMBU, 2015; KOUIDHI; AL QURASHI; CHAIEB, 2015; PALOMBO, 2011), sem apresentarem o risco de causar resistência bacteriana (CHINSEMBU, 2015).

Ademais, os termos “herbal” ou “fitoterápico” na embalagem relacionam-se ao fato de grande parte dos ingredientes ativos serem de origem vegetal (BHAT; HEDGE; RATHEESH, 2014). Componentes conhecidos por apresentarem alguma propriedade têm sido adicionados, como os extratos vegetais, óleos essenciais e outros compostos naturais, propondo ações de limpeza e anti-inflamatória, de prevenção à formação de biofilme, entre outras (CHINSEMBU, 2015; PANNUTI, 2003).

Em relação à inibição da formação de biofilme, associa-se tal propriedade ao uso de *Camellia sinensis* (chá verde), *Azadirachta indica* (nim), *Matricaria recutita* (camomila), *Vitis vinífera* (uva), *Eugenia caryophyllus* (cravo) (BATISTA *et al.*, 2014; KOUIDHI; AL QURASHI; CHAIEB, 2015), *Ocimum sanctum* (manjerição sagrado) (AGARWAL; NAGESH; MURLIKRISHNAN, 2010), sendo *Melaleuca alternifolia* (tea tree), *Aloe vera* e hortelã-pimenta (*Mentha piperita*) indicados para potencializar a ação antibacteriana (CHINSEMBU, 2015). Tal incorporação, com o intuito de substituir antimicrobianos de origem química como o TCS, tem sido motivada pelo fato de que o TCS produz resistência bacteriana por meio da

modificação do local alvo, da alteração das bactérias do microbioma, desencadeando resistência bacteriana e, por esse motivo, tem sido suprimido das formulações de diversos produtos para higiene humana e animal desde 2016 (WEATHERLY; GOSSE, 2017).

Para descrever de forma mais específica as propriedades de alguns dos produtos incorporados aos dentifrícios comerciais utilizados no presente estudo, o extrato de nim (*Azadirachta indica*), há tempos, tem sido apontado por possuir atividades antifúngicas, anti-inflamatórias, além de poder reduzir a capacidade de estreptococos colonizarem a superfície dos dentes (WOLINSKY *et al.*, 1996). Analogamente, o extrato de manjerição demonstra atividade contra *Streptococcus mutans*, sendo também usado para tratar algumas doenças (AGARWAL; NAGESH; MURLIKRISHNAN, 2010). *Vitis vinífera* (uva), mais especificamente a uva passa, tem sido associada à supressão do crescimento de bactérias orais que podem desencadear doenças (RIVERO-CRUZ *et al.*, 2008). *Aloe vera* na forma de gel apresenta propriedades anti-inflamatórias e antioxidantes, além de efeitos inibitórios sobre algumas bactérias periodontopatogênicas, cariogênicas e patogênicas oportunistas, por inibir a síntese de proteínas de algumas células bacterianas (FANI; KOHANTEB, 2012).

Além disso, a *Matricaria recutita* (camomila) produz efeitos antimicrobianos e anti-inflamatórios (BATISTA *et al.*, 2014), e os óleos essenciais extraídos de *Melaleuca alternifolia* (tea tree) são utilizados como inibidores tanto de bactérias cariogênicas quanto de periodontopatogênicas (ALLAKER; DOUGLAS, 2009), apresentando o poder de romper membranas de células microbianas e de inibir a adesão de *Streptococcus mutans* (CHINSEMBU, 2015). Sobre *Camellia sinensis* (chá verde), a literatura tem apontado para a sua atuação contra a cárie, atuando contra *Streptococcus mutans* e *Streptococcus sobrinus*, além de eliminar o mau hálito e apresentar propriedades antivirais (ALLAKER; DOUGLAS, 2009; NAROTZKI *et al.*, 2012). Óleo de cravo (*Eugenia caryophyllus*) tem eficácia contra bactérias cariogênicas e periodontopatogênicas (MOON; KIM; CHA, 2011). Existe recomendação para o uso de extrato etanólico da raiz de alcaçuz (*Glycyrrhiza glabra*) para o controle de cárie, uma vez que ele produz efeito antibacteriano (MALVANIA *et al.*, 2019), assim como óleos essenciais de hortelã-pimenta (*Mentha piperita*) e de erva-doce (*Foeniculum vulgare*) têm ação antibacteriana contra bactérias cariogênicas, incluindo *Streptococcus mutans*, e retardam a formação de biofilme desse microrganismo *in vitro* (WIWATTANARATTANABUT; CHOONHARUANGDEJ; SRITHAVAJ, 2017).

Nessa perspectiva, é comum que muitos fabricantes de dentifrícios herbais, motivados principalmente pelo risco de fluorose dental, excluam o fluoreto de sua composição, mesmo sendo comprovado o fato de que esse item traz o benefício de redução da desmineralização e

aumento da remineralização presente no processo carioso (SHEEN; PONTEFRACT; MORAN, 2001).

3 HIPÓTESE NULA

Os dentifrícios comerciais à base de produtos naturais não têm ação preventiva contra lesões iniciais de cárie em esmalte, não conseguindo inibir a formação de biofilme nem impedir a desmineralização em esmalte.

4 OBJETIVOS

4.1 Objetivo Geral

Avaliar o efeito *in vitro* de dentifrícios à base de ingredientes naturais na prevenção à formação de lesões iniciais de cárie em esmalte humano, com ênfase à observação de cada produto quanto ao seu efeito antibiofilme e quanto ao controle de desmineralização em esmalte.

4.2 Objetivos Específicos

- Avaliar quantitativamente o biofilme formado por meio da contagem de Unidades Formadoras de Colônia (UFC) e de peso seco;
- Analisar quantitativamente a área de perda mineral de cada espécime por meio da Microdureza Longitudinal;
- Avaliar qualitativamente a perda mineral em superfície de esmalte, por Microscopia Eletrônica de Varredura, bem como em subsuperfície de esmalte, por meio de Microscopia de Luz Polarizada.

5 MATERIAL E MÉTODOS

5.1 Aspectos éticos

Após submissão do projeto na Plataforma Brasil e posterior aprovação no Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Medicina da Universidade Federal do Ceará (CEP/UFC/PROPESC), #3.834.495, realizou-se o estudo utilizando blocos de esmalte obtidos de terceiros molares humanos como unidades experimentais. Os dentes extraídos (por razões clínicas) foram coletados após o recebimento do Termo de Doação de Dentes assinado pelos pacientes atendidos na Clínica de Cirurgia da Faculdade de Farmácia, Odontologia e Enfermagem (FFOE) da UFC, conforme a Resolução 466/2012.

5.2 Delineamento experimental

Este estudo caracterizou-se por ser *in vitro*, laboratorial, randomizado e consistiu na investigação da eficácia anticárie de dentifrícios naturais comerciais. Foram realizadas análises de biofilme por intermédio da avaliação de Unidades Formadoras de Colônia (UFC) e peso seco de biofilme; e as alterações na estrutura do esmalte foram avaliadas por Microdureza Longitudinal (ML), morfologia das superfícies de esmalte por meio da Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) e da Microscopia de Luz Polarizada (MLP). Os produtos testados encontram-se descritos na Tabela 1 e o delineamento experimental está esquematicamente representado na Figura 1, mostrando a sequência iniciada pela confecção dos blocos de esmalte e análise das microdurezas de superfície dos espécimes, até as análises.

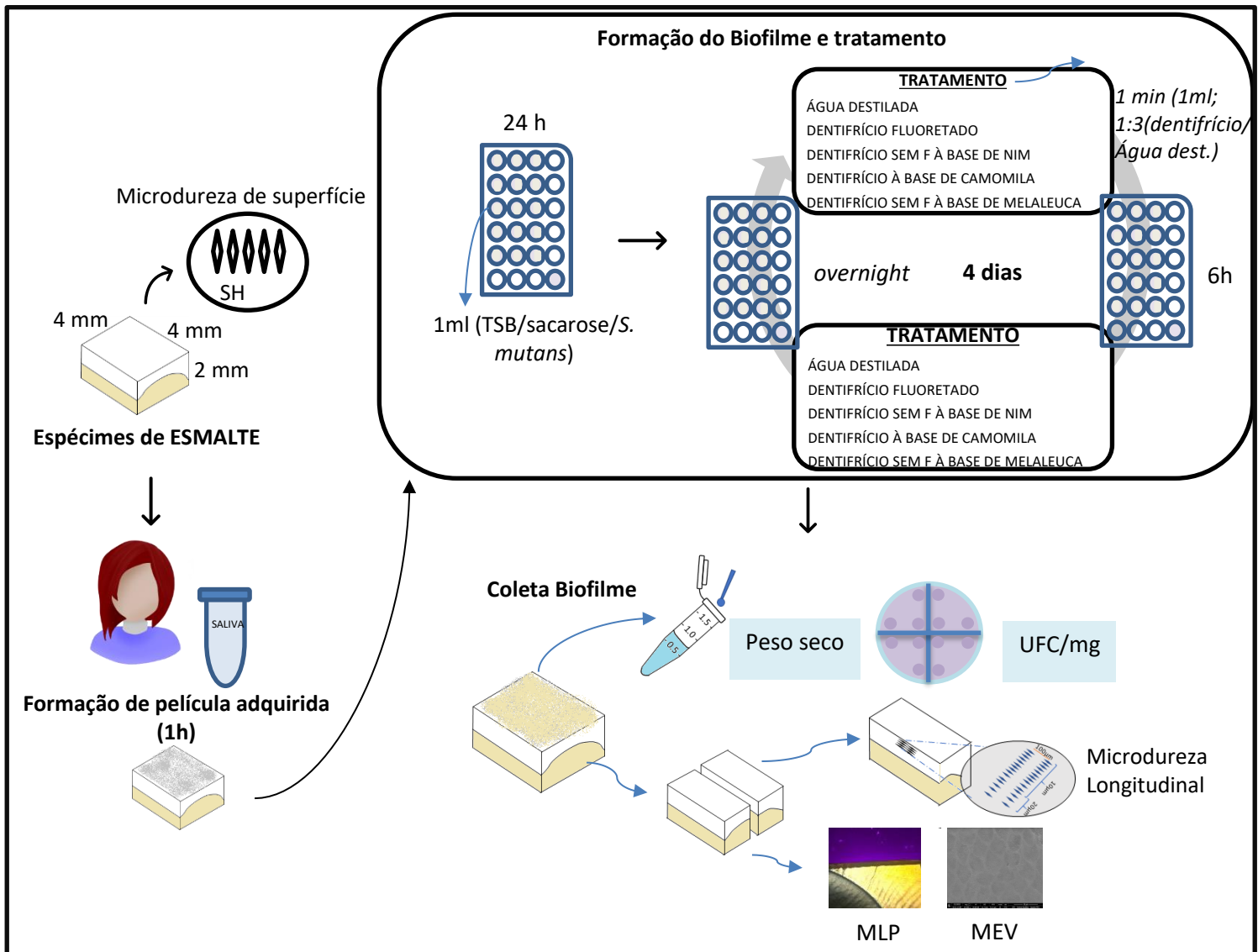
5.3 Preparo dos espécimes de esmalte

Blocos de esmalte foram obtidos a partir das faces vestibular e lingual de terceiros molares humanos hígidos, armazenados em solução de timol a 0,1% sob refrigeração (4°C). Os dentes, após serem fixados em placas de acrílico (40 x 40 x 5 mm), foram seccionados transversalmente na junção amelocementária, para separar as coroas das raízes, por meio do emprego de disco diamantado dupla face (Modelo 12205, Extec®, Enfield, CT, EUA) montado a uma cortadeira metalográfica (Isomet®, Buehler Ltd., Lake Bluff, IL, EUA), sob baixa rotação e refrigeração abundante. Realizaram-se cortes seriados para obtenção de blocos contendo esmalte (4 x 4 x 2 mm). Os mesmos blocos foram adaptados em uma politriz

metalográfica automática (Buehler, modelo AutoMet 250, Lake Bluff, IL, EUA), e a planificação aconteceu sob refrigeração utilizando-se lixas de granulação #600 e #1200. Em sequência, as amostras foram polidas com disco de feltro e suspensão de diamante para polimento de 1 μm (MetaDi, Buehler Ltd., Lake Bluff, IL, EUA) e, entre cada etapa, foram conduzidas a uma cuba ultrassônica (Unique, Indaiatuba, SP, Brasil) por 10 minutos para limpeza.

Posteriormente, os dados de microdureza de superfície foram obtidos, com a finalidade de padronizar as amostras, utilizando um diamante acoplado a um microdurômetro (Microhardness Tester FM 100, Future Tech, Fujisaki, Kawasaki-City, Japan) com carga estática de 25g por 5 segundos em esmalte (ARGENTA; TABCHOURY; CURY, 2003). Foram realizadas cinco indentações na região central de cada bloco, separadas entre si por uma distância de 100 μm . Do total de espécimes preparados, avaliados e calculada a média de microdureza, foram selecionados 45 dentre os 137 que apresentaram variação de 10% em torno da média encontrada (306,308) e aleatoriamente divididos em grupos para o estudo (variação KHN de 275,6772 a 336,9388).

Figura 1 - Esquema representativo do delineamento experimental.



Fonte: Elaborada pelo autor.

Tabela 1 - Composição de dentifrícios comerciais contendo agentes naturais e do dentifrício fluoretado.

GRUPO	TRATAMENTO	PRODUTO	FABRICANTE	LOTE	CIDADE/PAÍS
I n=9	Controle Negativo (CN)	Água destilada	-	-	-
II Dentifrício Fluoretado n=9	Pasta à base de fluoreto estanhoso a 0,454% (0,16% p / v de íon fluoreto), Glicerina, Sílica Hidratada, Hexametáfosfato de Sódio, Propilenoglicol, PEG-6, Água, Lactato de Zinco, Fosfato Trissódico, Sabor, Lauril Sulfato de Sódio, Gluconato de Sódio, Carragenina, Sacarina de Sódio, Goma Xantana, Azul.	Crest Pro Health Advanced®	Procter & Gamble INC	92317	Toronto, Ontário, Canadá
III Dentifrício de Nim n=9	Pasta à base de extratos supercríticos orgânicos certificados: carbonato de cálcio, sorbitol, água, glicerina, sódio lauroil glutamato, xilitol, goma xantana, Cyamopsi Tetragonoloba (Guar) Goma, <i>Vitis Vinífera</i> (semente de uva), raiz de <i>Glycyrrhiza glabra</i> (Alcaçuz), <i>Foeniculum vulgare</i> (erva-doce), broto de <i>Eugenia Caryophyllu</i> (cravo), Folha e casca de <i>Azadirachata Indica</i> (Nim), óleo de <i>Mentha piperita</i> (Hortelã-pimenta), Sorbato de potássio, Óleo de <i>Mentha viridi</i> , ácido Ascórbico.	Neem Toothpaste™	Theraneem Naturals	M0518004	Bowling Green, Flórida, USA
IV Dentifrício de Camomila n=9	Pasta à base de água, glicerina, eritritol, sabores orgânicos, camomila, goma guar, suco da folha da aloe vera, óleo de hortelã-pimenta (<i>Mentha piperita</i>), Extrato de madeira de quilaia (<i>Quillaja saponaria</i>), ácido cítrico, concentrado de água de coco, maltodextrina de tapioca, arroz (<i>Oryza sativa</i>) em pó, extrato de folha de nim, Extrato de flor de <i>Rosa centifolia</i> (rosa), extrato de flor de hibisco, extrato de folha de manjerição sagrado (<i>Ocimum sanctum</i>), pó da folha de chá verde (<i>Camellia sinensis</i>), extrato de jasmin (<i>Jasminum grandiflorum</i>), goma xantana.	Organic Matcha Mint® Toothpaste	Radius	0385H8C	Kutztown, Pensilvânia, USA
V Dentifrício de Melaleuca n=9	Pasta à base de carbonato de cálcio, água, sorbitol, glicerina, Sarcosinato de lauroil sódico, sílica hidratada, sabor, pirofosfato tetrasódico, goma de celulose, esteviosídeo, benzoato de sódio, óleo da folha de melaleuca (tea tree).	Tea Tree Toothpaste™	Thursday Plantation	441700	Eight Mile Plains, Queensland, Australia

Fonte: Elaborada pelo autor.

5.4 Investigação da eficácia anticárie de dentifrícios naturais

5.4.1 Formação dos biofilmes *in vitro*

Para a realização deste experimento, foram utilizados 3 espécimes por grupo (n=3), em triplicata, totalizando 45 espécimes.

A bactéria utilizada para esta pesquisa foi o *Streptococcus mutans* (cepa UA 159, ATCC, Manassas, Virginia, EUA), obtida por meio de doação do Laboratório de Biomedicina da Universidade Federal do Ceará, estocada sob refrigeração a -80°C (para que suas características bioquímicas e seu perfil de sensibilidade a antimicrobianos permanecessem inalterados).

Inicialmente, as cepas bacterianas foram semeadas em placa de ágar sangue por 48 horas a 37°C com atmosfera de 5% de CO₂ (Thermo Fisher Scientific Inc, Waltham, MA, USA). Em seguida, 6 a 8 colônias foram transferidas para um tubo contendo 9 mL de Caldo Triptona Soja (Tryptic Soy Broth – TSB; Kasvi, São José dos Pinhais, PR, BRASIL) suplementado com 45 mg de extrato de levedura e 1 mL de glicose a 10% e incubado por 18 horas a 37°C, sob condições de microaerofilia (5% de CO₂; Thermo Fischer Scientific Inc., Marietta, OH, USA) (LIMA *et al.*, 2020). Após as 18 horas, o inóculo inicial foi utilizado para a formação de biofilme na proporção de 100 µL para cada 45 mL de meio de cultivo (TSB + extrato de levedura) e 5 mL de sacarose a 10%.

Para esse experimento, os espécimes de blocos de esmalte, previamente submetidos à esterilização em autoclave, foram submetidos à formação de película adquirida. Por meio de doação de um voluntário saudável (em jejum de 12 horas e sem escovar os dentes) não identificado, a saliva foi coletada pela manhã, por meio da mastigação de um pedaço de um filme plástico (Parafilm M, Laboratory Film, Pechiney plastic- packaging, Chicago). A saliva estimulada no primeiro minuto foi descartada, e o restante, recolhido. A saliva aproveitada foi misturada com tampão de adsorção (50 mM KCl, 1.0 mM KPO₄, 1.0 mM CaCl₂, 0.1 mM MgCl₂, pH = 6.5) (proporção de 1:1) e com inibidor de protease fluoreto de fenilmetilsulfonil (PMSF) (1:100), levemente agitada e, posteriormente, clarificada por centrifugação durante 10 min, a 3500 rpm, numa centrífuga de pré-arrefecimento (4°C) (NOVATÉCNICA, Modelo NT815, Piracicaba, SP, Brasil). O sobrenadante foi coletado, filtrado com um filtro de acetato de celulose com tamanho de poro de 0,22 µm (VACCUM DRIVEN FILTERS, Kasvi, Modelo K15-1250, China) e utilizado para a formação da película adquirida, sendo distribuído em placa de 24 poços (1 mL por poço), seguindo-se a imersão dos blocos de esmalte esterilizados, sendo

o conjunto placa + conteúdo filtrado + blocos de esmalte levado a um agitador orbital a 37°C por 1 hora (LIMA *et al.*, 2020).

Decorrido esse período, os blocos de esmalte foram transferidos para uma nova placa de 24 poços, onde se adicionou previamente o meio contendo o inóculo inicial + caldo TSB + sacarose distribuído em 15 poços para que os biofilmes de *S. mutans* UA 159 fossem formados, sendo 1 mL por poço. Os conjuntos blocos de esmalte com película adquirida + inóculo foram incubados em estufa de CO₂ a 37°C, a 5% de CO₂, durante 24 horas, em repouso, para permitir formação de biofilme (DUARTE *et al.*, 2006), e se utilizou 1 poço no canto inferior direito da placa de poços para se adicionar 1 mL da mistura (inóculo inicial + caldo TSB + sacarose), sem bloco de esmalte, como controle. Por cinco dias consecutivos, os blocos foram transferidos para novas placas com caldo estéril para evitar saturação.

5.4.2 Preparo das soluções e aplicação dos tratamentos

As soluções de tratamentos foram preparadas na proporção de 1:3 (dentífrício/água destilada estéril) em relação ao peso dessas substâncias e em condições assépticas imediatamente antes do início do tratamento (PANARIELLO *et al.*, 2020). Os preparos das soluções de tratamento aconteceram pela manhã e tarde, os tratamentos consistiam em: água destilada estéril (controle negativo, pH= 5,65), dentífrício fluoretado (Crest Pro Health Advanced[®], pH= 5,41), dentífrício sem flúor à base de nim (Neem Toothpaste[™], pH= 7,88), dentífrício sem flúor à base de camomila (Organic Matcha Mint[®] Toothpaste, pH= 5,65) ou dentífrício sem flúor à base de melaleuca (Tea Tree Toothpaste[™], pH= 8,76).

Decorridas as 24 horas de incubação dos conjuntos blocos de esmalte com película adquirida + inóculo, os biofilmes formados em seus espécimes receberam seus tratamentos por imersão no poço durante 1 minuto, duas vezes por dia, com intervalo de 6 horas entre o primeiro e o segundo tratamento do dia, de acordo com o produto de seu respectivo grupo, até o quarto dia do período experimental (DUARTE *et al.*, 2006). Cada poço contava com 1 mL de solução de tratamento. O meio de cultivo foi trocado diariamente sem adição do inóculo. Os espécimes foram removidos da placa com o meio de cultura, imersos por 3 vezes em solução salina a fim de remover o biofilme fracamente aderido, em seguida imersos em suas respectivas soluções de tratamento por 1 minuto e, posteriormente, receberam um novo banho de solução salina para retirar qualquer resíduo da solução de tratamento. Os meios dos grupos foram trocados uma vez ao dia, após o tratamento realizado pela manhã (PANARIELLO *et al.*, 2020). A seguir, no quinto dia de formação de biofilme, os blocos de esmalte de todos os grupos foram imersos 3

vezes em solução salina estéril (NaCl 0,89%), a fim de remover o biofilme fracamente aderido, e foram coletados para análises (DUARTE *et al.*, 2006).

5.4.3 Análise de biofilme

Após 5 dias de desenvolvimento de biofilme e finalizado o período de tratamento, em cada uma das triplicatas, o biofilme foi analisado por meio da viabilidade bacteriana (UFC) e determinação do peso seco (LIMA *et al.*, 2020). Realizou-se coleta dos biofilmes do esmalte de cada bloco com espátulas estéreis com intuito de remover as células fortemente aderidas; colocou-se esse material obtido em microtubos de polipropileno estéreis com 1 mL de solução salina estéril e, em seguida, cada microtubo com seu biofilme e solução salina foi submetido à sonicação (Sonicador Digital Sonifer™ 450, 50/60Hz, 4A, Branson Ultrasonics Corporation, Danbury, EUA) com 3 pulsos de 7W, durante 15 segundos cada pulso, e intervalo de 15 segundos entre cada pulso em gelo, de forma a possibilitar a adequada dispersão das células (LIMA *et al.*, 2020). Posteriormente, as suspensões foram diluídas em série de 10^{-1} até 10^{-7} , e uma alíquota de cada diluição foi semeada em infusão cérebro-coração BHI ágar. Logo após, elas foram incubadas na temperatura de 37 °C, por 48 horas, em condições de microaerofilia (5% de CO₂). Decorrido esse tempo, realizou-se contagem das Unidades Formadoras de Colônia (UFC).

O número de UFC/mg de peso seco de biofilme foi estabelecido por meio da adição de 600 µL de etanol puro frio (-20 °C) a 200 µL da suspensão de biofilme dentro de microtubos pré-pesados. Os tubos foram armazenados em freezer a -20°C por 18h. Após esse período, realizou-se sua centrifugação (4.000 RPM por 10 min a 4°C), e, logo a seguir, descartou-se cuidadosamente o sobrenadante; os microtubos com seus precipitados foram levados a um dessecador a vácuo contendo sílica e então deixados por 48 horas para remoção da umidade (DUARTE *et al.*, 2008). Passado esse tempo, os microtubos foram pesados novamente. Em sequência, a proporção de Unidades Formadoras de Colônia por mg de biofilme (UFC/mg) foi calculada individualmente, a cada triplicata (DUARTE *et al.*, 2006).

Os espécimes de esmalte com seus biofilmes removidos foram acondicionados em microtubos com algodão umedecido em água destilada para posterior análise de Microdureza Longitudinal (ML), Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) e Microscopia de Luz Polarizada (MLP).

5.4.4 Microdureza Longitudinal pós formação de biofilme

Subsequentemente, todos os blocos foram seccionados de forma longitudinal em seu centro, embutidos em resina acrílica em embutidora metalográfica (Arotec, modelo PRE 30 Mi, Cotia, SP, Brasil), e as superfícies de corte (1 metade de cada bloco) foram adaptadas em politriz metalográfica automática e planificadas sob refrigeração, utilizando-se lixas de granulação na sequência #320 (3M™, Sumaré, SP, Brasil), #600 (Buheler®, Lake Bluff, IL, EUA) e #1200 (DeWalt®, Baltimore, MD, EUA). Depois, receberam polimento com disco de feltro e suspensão de diamante para polimento de 1 µm (MetaDi, Buehler Ltd., Lake Bluff, IL, EUA) e, entre cada etapa, foram conduzidos a uma cuba ultrassônica (Unique, Indaiatuba, SP, Brasil) por 10 minutos para limpeza.

A microdureza da secção transversal foi medida na superfície interna, para a determinação da área de perda mineral (ΔS). Para mapear a lesão, realizou-se análise de Microdureza Longitudinal, fazendo-se três sequências de 15 indentações de Knoop nas distâncias de 10, 20, 30, 40, 50, 60, 80, 100, 120, 140, 160, 180, 200, 300 e 400 µm da superfície externa do esmalte, uma na área central dos blocos e outras duas a 100 µm à direita e à esquerda (ALMEIDA *et al.*, 2019; MANARELLI *et al.*, 2014). Os valores médios dos três pontos medidos foram calculados em cada distância. A área da dureza x profundidade da lesão (ΔS) foi calculado pela integração numérica utilizando uma regra trapezoidal pela diferença entre a área sob a curva do esmalte sadio menos a área desmineralizada (SOUSA *et al.*, 2009).

5.4.5 Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)

Após a análise da microdureza, 3 amostras representativas de cada grupo foram selecionadas aleatoriamente e preparadas para análise em MEV. Tal preparação foi feita com disposição das amostras em *stubs*, seguida da metalização com ouro. Os espécimes foram, então, examinados para que se observasse a morfologia das superfícies de esmalte após os diferentes tratamentos, com o uso de um microscópio eletrônico de varredura (Quanta FEG 450 -FEI Company, Oregon, USA), com magnitudes de 500x, 2.000x, 5.000x e 10.000x e potência de 20kV.

5.4.6 Análise das regiões de desmineralização em esmalte por meio da Microscopia de Luz Polarizada (MLP)

Para visualização dos espécimes em microscópio de luz polarizada, cortes de duas amostras representativas de cada grupo selecionadas aleatoriamente foram polidos manualmente em lixa de granulação de #600 até chegar a uma espessura de aproximadamente $100\mu\text{m} \pm 20$ e, em seguida, receberam lavagem ultrassônica de 10 min. Posteriormente, os cortes foram imersos em água deionizada e colocados em lâmina de vidro; sobre esta foi depositada uma lamínula. Análises qualitativas da microestrutura do esmalte foram realizadas em um aumento de 50x. Todas as imagens geradas foram capturadas por meio de uma câmera digital acoplada ao microscópio de luz polarizada (Leica MC170, HD, Leica Microsystems, Wetzlar, Alemanha), transferidas para o computador e analisadas com auxílio do programa de captura de imagens Image J (National Institutes of Health, Bethesda, Maryland, EUA).

5.5 Análise estatística

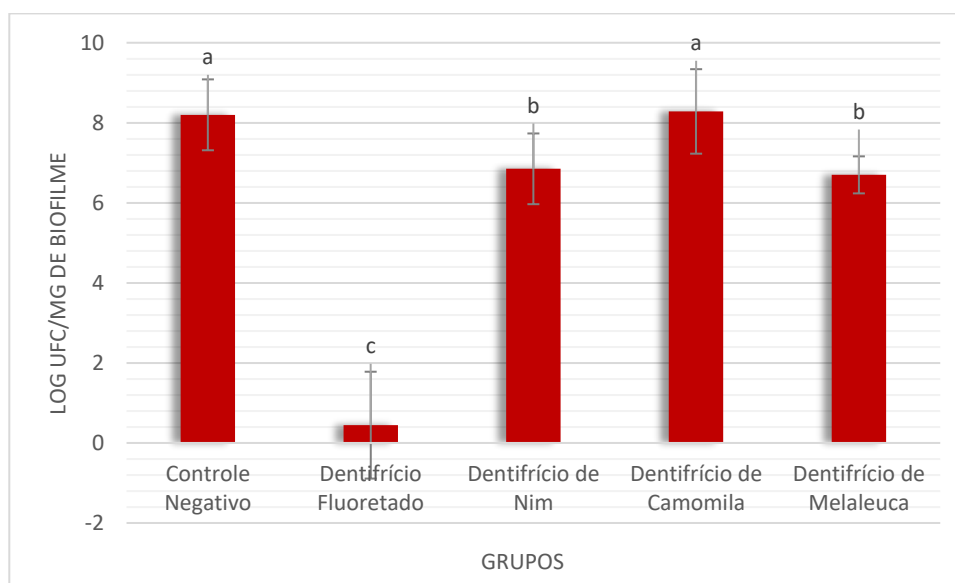
Todas as variáveis quantitativas foram inicialmente analisadas por meio do teste Kolmogorov–Smirnov, objetivando verificar a distribuição normal dos resultados. Para os dados de UFC, foi realizada uma transformação logarítmica, como segue a equação: $y = \log_{10} x = \log x$. Dados referentes à contagem de UFC, peso seco, Delta S e análise dos dados de Microdureza Longitudinal foram testados através da análise de variância ANOVA (One Way), seguidos de pós-teste de Tukey, adotando um nível de significância de 5%. As análises estatísticas foram realizadas utilizando o software SPSS 22.0 para Windows (SPSS Inc. Chicago, IL. USA).

6 RESULTADOS

6.1 Unidades Formadoras de Colônia (UFC) e peso seco

Quanto ao efeito antimicrobiano, analisado por meio de contagem de UFC, verificou-se diferença entre os grupos ($p < 0,001$), como apresentado na Figura 2 (letras distintas mostram diferenças significativas entre os dentifrícios e a água destilada). As médias e o desvio padrão dos valores referentes ao peso seco do biofilme (mg/ml) apresentaram diferenças ($p < 0,001$), descritas na Tabela 2. Nesse contexto, infere-se que os valores médios de UFC do grupo tratado com o dentifrício fluoretado foram menores do que nos grupos tratados com água destilada, dentifrício de nim, de camomila e de melaleuca; sem diferença significativa nem entre os grupos controle negativo e dentifrício de camomila, nem entre dentifrício de nim e de melaleuca. Entretanto, a média de UFC no grupo controle positivo (dentifrício fluoretado) foi marcadamente menor do que nos outros grupos.

Figura 2 – Média e desvio padrão da contagem de UFC dos grupos testados ($p < 0,001$).



Fonte: Elaborado pelo autor.

A Tabela 2, com as médias e o desvio padrão do peso seco obtido em cada grupo testado após os 5 dias de formação de biofilme, mostra que o peso seco do biofilme de *S. mutans* dos grupos controle negativo, dentifrício de nim e dentifrício de camomila não foi significativamente diferente (letras diferentes mostram diferenças significativas entre os dentifrícios e a água destilada). Os grupos tratados com dentifrício de nim ou com controle negativo apresentaram diferença se comparados ao dentifrício fluoretado, porém o valor deste

não apresentou diferença significativa em relação aos grupos dentifrícios de camomila e dentifrício de melaleuca.

Tabela 2 - Médias \pm desvio padrão do peso seco obtido em cada grupo testado ($p < 0,001$).

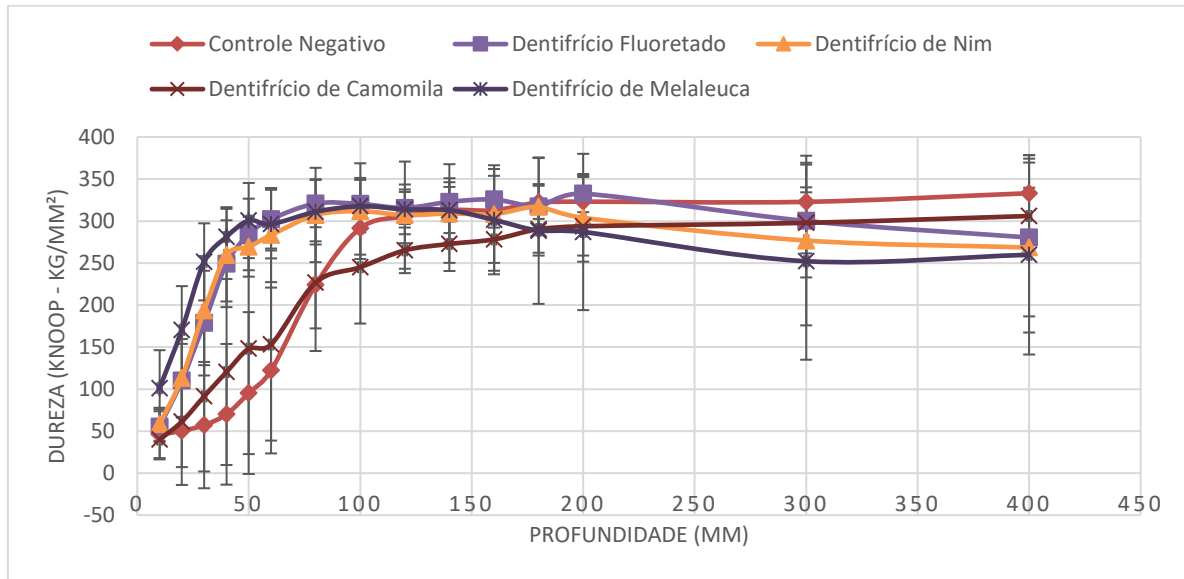
	Grupos				
	<i>Controle Negativo</i>	<i>Dentifrício Fluoretado</i>	<i>Dentifrício de Nim</i>	<i>Dentifrício de Camomila</i>	<i>Dentifrício de Melaleuca</i>
Peso seco (mg/ml)	2,77 \pm 0,89 ^a	1,40 \pm 0,16 ^c	2,53 \pm 0,67 ^{ab}	2,29 \pm 0,85 ^{abc}	1,65 \pm 0,50 ^{bc}

Fonte: Elaborada pelo autor.

6.2 Microdureza Longitudinal Knoop

Os dados de microdureza em cada profundidade da estrutura dental, de acordo com os grupos, estão ilustrados no gráfico da Figura 3. Na profundidade de 10 μm , observou-se uma maior dureza para o grupo que recebeu tratamento com o dentifrício à base de melaleuca ($p < 0,05$), diferindo dos demais. Quanto às profundidades de 20 e 30 μm , os grupos tratados com dentifrício fluoretado, dentifrício de nim e dentifrício de melaleuca apresentaram as maiores durezas, diferindo do controle negativo e do dentifrício de camomila, os quais apresentaram os menores padrões de dureza. Entretanto, a 20 μm , dentifrício fluoretado e dentifrício de nim mostraram resultados também estatisticamente semelhantes entre si, de forma análoga à água destilada e ao dentifrício de camomila. A partir da profundidade de 40 até 80 μm , água destilada e dentifrício de camomila ($p > 0,05$) apresentaram os menores padrões de dureza, diferindo do dentifrício fluoretado, dentifrício de nim e dentifrício de melaleuca ($p > 0,05$). Na profundidade de 100 μm , apenas o controle negativo e dentifrício de camomila apresentaram valores diferentes dos demais. E a partir de 120 μm até 400 μm , todos os grupos apresentaram valores semelhantes.

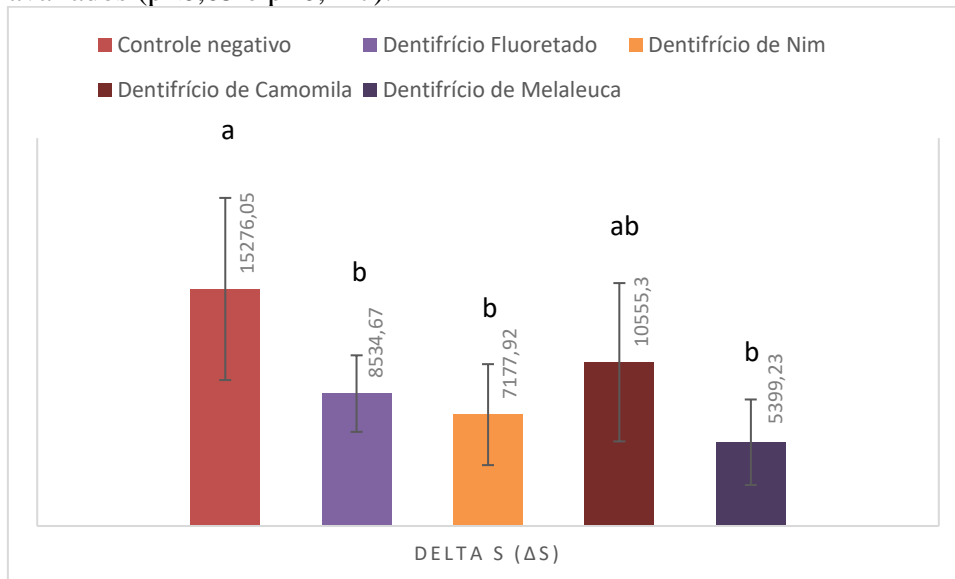
Figura 3 - Gráfico representativo do perfil de dureza por grupo ($p < 0,05$).



Fonte: Elaborado pelo autor.

Como observado no gráfico da Figura 4, que representa a média e o desvio padrão do perfil da perda de dureza delta S (ΔS) do esmalte dos grupos avaliados após a formação de 5 dias de biofilme, o grupo tratado com água destilada apresentou a maior área de perda mineral e conseqüentemente maior padrão de perda de dureza, o qual foi estatisticamente menor para os outros grupos ($p < 0,05$), porém semelhante ao dentifrício de camomila ($p = 0,227$). Dentifrício fluoretado, de nim e de melaleuca apresentaram perfis de perda mineral semelhantes entre si e diferentes da água destilada. No entanto, houve semelhança de dentifrício de camomila com dentifrício fluoretado, de nim e de melaleuca.

Figura 4 - Média \pm desvio padrão do perfil da perda de dureza (ΔS) do esmalte dos grupos avaliados ($p < 0,05$ e $p = 0,227$).

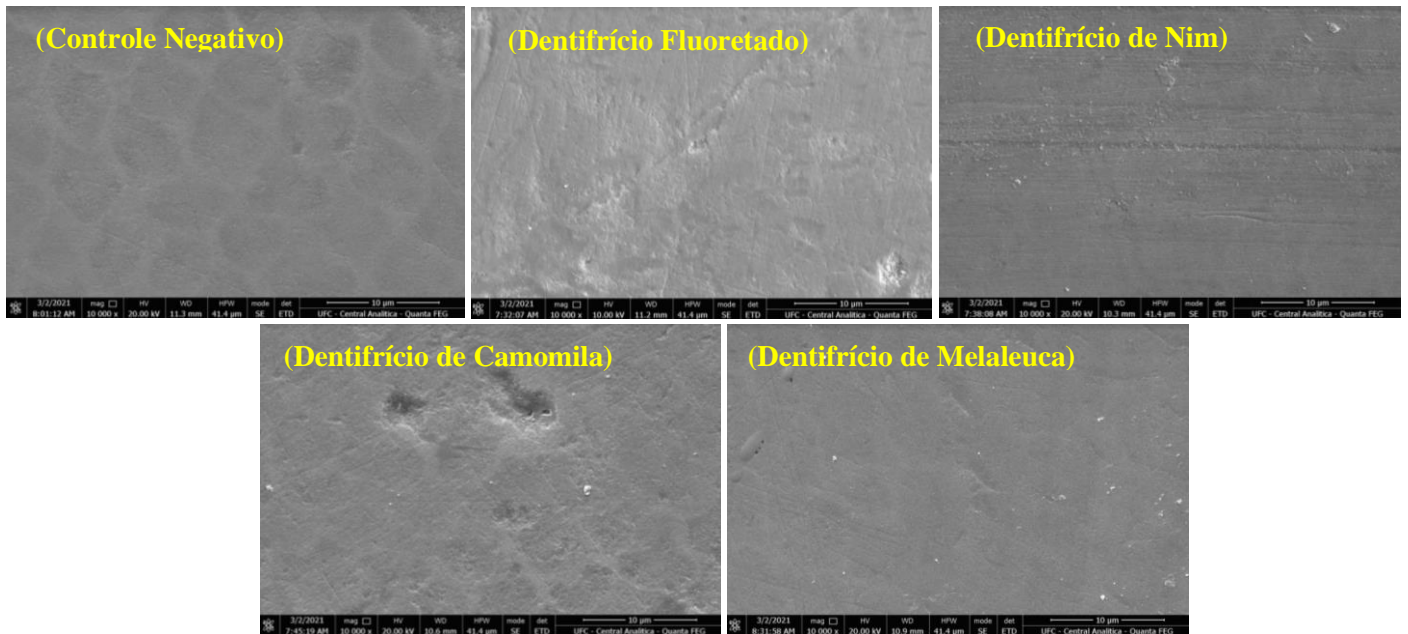


Fonte: Elaborado pelo autor.

6.3 Microscopia Eletrônica de Varredura

A análise em microscópio eletrônico de varredura com amplitude de 10.000X mostra, na Figura 5, imagens das superfícies dos espécimes tratados com cada dentifrício e dos que não receberam tratamento (água destilada). Nos grupos controle negativo e dentifrício de camomila, observa-se a exposição dos prismas de esmalte (semelhante a uma estrutura de favos de mel ou de escamas de peixe), sendo mais evidente em controle negativo e tendo em dentifrício de camomila uma exposição mais discreta, além de algumas áreas erodidas (Figuras A e D, respectivamente). Nos grupos dentifrício fluoretado, dentifrício de nim e dentifrício de melaleuca, observa-se cobertura dos prismas de esmalte, semelhante a uma cobertura homogênea, sugerindo menor desmineralização; porém, em dentifrício de nim, a superfície apresenta-se com maior lisura.

Figura 5 - Imagens em MEV representativas dos espécimes de esmalte após o experimento. Aumento de 10.000X.



Fonte: Elaborada pelo autor.

6.4 Microscopia de Luz Polarizada

A Figura 6 mostra cortes de amostras representativas de cada grupo, montados em lâminas e observados ao microscópio com luz polarizada. Verificam-se lesões de subsuperfície na estrutura do esmalte em todos os espécimes de esmalte; porém, em controle negativo e dentifrício de camomila, a lesão apresenta maior espessura e, portanto, maior profundidade. Em dentifrício fluoretado, de nim e de melaleuca, as espessuras da lesão são mais discretas.

Figura 6 - Imagens representativas de microscopia de luz polarizada (MLP) dos espécimes de esmalte com lesão de subsuperfície formada durante o período experimental. Aumento de 50X.



Fonte: Elaborada pelo autor.

7 DISCUSSÃO

Neste estudo, avaliou-se a eficácia na prevenção à formação de lesões iniciais de cárie, no tocante à inibição de biofilme e de controle da desmineralização do esmalte de alguns dentifrícios herbais comerciais, diante da presença de biofilme de *Streptococcus mutans* com 5 dias de formação, aderido à superfície do esmalte em meio contendo sacarose, comparados a um controle negativo e a um dentifrício com fluoreto de estanho em sua formulação.

O método empregado no experimento do presente estudo, realizado com base nos trabalhos de Duarte *et al.* (2006, 2008), Lima *et al.* (2020) e Panariello *et al.* (2020), teve como característica a colocação das soluções de dentifrícios diretamente em contato com biofilme espacialmente estruturado, formado sobre os espécimes de esmalte, com uma troca diária de meio de cultura e com dois momentos de tratamento também diários. É um método mais complexo se comparado ao que utiliza a suspensão de microrganismos, descrito no trabalho de Vitt *et al.* (2015), o qual consiste basicamente em colocar as soluções de produtos testados em contato com suspensões de microrganismos (em seu meio de cultura apropriado) uma única vez, diluir, semear e incubar em meio e em condições adequadas, a depender do microrganismo de teste, e posteriormente observar os resultados.

Nesse viés, o presente estudo mostrou, pelos resultados de contagem de Unidades Formadoras de Colônia (UFC), que os grupos tratados com os dentifrícios de composição natural não sofreram redução de biofilme considerável, se comparados ao grupo tratado com o dentifrício fluoretado; contudo, apesar de não serem estatisticamente semelhantes a ele, os resultados do dentifrício de nim e de melaleuca, semelhantes entre si, mostraram-se melhores do que o controle negativo que, por sua vez, foi análogo ao dentifrício de camomila. Em relação ao peso seco, não houve diferença estatística significativa entre o grupo tratado com dentifrício fluoretado e os grupos tratados com dentifrício de camomila e com o de melaleuca.

Em estudo *in vitro* realizado por Anushree *et al.* (2015), foi testada a eficácia antimicrobiana de dentifrícios herbais, homeopáticos e fluoretados com Triclosan (TCS), sendo três tipos para cada (dois dentifrícios herbais continham nim em sua composição), para 4 patógenos orais, dentre esses o *Streptococcus mutans*. Utilizou-se o método de difusão em ágar modificado, onde culturas dos microrganismos foram espalhadas nas placas de ágar e se observaram as zonas de inibição promovidas pelas diluições de cada dentifrício. Verificou-se que os três produtos herbais apresentaram significativa eficácia contra *S. mutans*, sugerindo o uso dos dentifrícios herbais como alternativa aos dentifrícios fluoretados com TCS. O nim, de acordo com a literatura, possui azadiractina, um terpenoide responsável pela eficácia

antibacteriana (GEORGE; SHETTY; HEDGE, 2016). Porém, Anushree *et al.* (2015) mencionam que seus resultados podem não ter aplicabilidade clínica e sugerem testes *in vivo* porque, dentre outras razões, o método utilizado depende da capacidade de difusão das soluções através do ágar. Já no caso do presente estudo, que utilizou dentifrício contendo nim, não se percebeu considerável eficácia de tal dentifrício na redução de UFC quando se utilizou o inóculo para promover formação de biofilme diretamente sobre a superfície dos blocos de esmalte dentário. Isso recai sobre a afirmação de que o biofilme é uma comunidade espacialmente estruturada e conta com uma matriz na qual é envolta, o que também poderia dificultar a difusão e a ação do produto.

Já em estudo *in vitro* realizado por Braga *et al.* (2019), com 3 dentifrícios e 3 enxaguantes bucais à base de substâncias naturais/fitoterápicas comparados a produtos convencionais (controles positivos), utilizando biofilme de microcosmo, verificou-se eficácia antimicrobiana e redução significativa da profundidade da lesão de apenas um dentifrício, cujos ingredientes ativos naturais eram extratos de própolis e de mirra (*Commiphora myrrha*), e um enxaguatório contendo, entre outros, malva (*Malva sylvestris*), mentol, TCS e fluoreto de sódio como agentes ativos. Os outros dois dentifrícios com composição natural utilizados, além de não apresentarem efeito antimicrobiano, tinham extrato de uva (*Vitis vinifera*) e de flor de camomila; óleo de hortelã-pimenta (*Mentha piperita*) e de folhas de melaleuca (*Melaleuca alternifolia*), respectivamente. Esses ingredientes fazem parte também das formulações dos dentifrícios utilizados no presente estudo. A melaleuca, dentre os seus diversos componentes, conta principalmente com o terpinen-4-ol, associado especificamente aos potenciais antimicrobiano e anti-inflamatório (HART *et al.*, 2000; NOGUEIRA *et al.*, 2014). Braga *et al.* (2019) sugerem que provavelmente a concentração do agente natural no dentifrício o qual apresentou efeito antimicrobiano esteja reduzida, uma vez que a produção de polissacarídeos extracelulares não foi afetada. Perceberam redução apenas na viabilidade bacteriana; além disso, a respeito do mesmo produto, também consideraram que os ingredientes podem interferir na biodisponibilidade de seus agentes ativos. Essas afirmações podem ser aplicadas para o presente trabalho, sugerindo realização de mais estudos que utilizem, inclusive, biofilme de microcosmo e condições mais próximas do ambiente bucal para verificar melhor a aplicabilidade clínica dos produtos testados. Ademais, possivelmente os ingredientes ativos que coincidem em ambos os trabalhos não estejam ainda numa concentração eficaz para apresentar efeito antimicrobiano.

Em um experimento realizado por Song *et al.* (2020) para investigar a eficácia contra *S. mutans* do óleo de melaleuca diluído, o microrganismo foi utilizado na forma planctônica e em

biofilme; verificou-se que essa substância apresenta-se como um potencial agente anticariogênico, podendo inibir crescimento, produção de ácidos e adesão de *S. mutans*. Porém, esses autores declaram como limitação o fato de terem utilizado um biofilme monoespécie, pois se sabe que um biofilme cariogênico é formado por mais de uma espécie de bactérias. No tocante ao presente trabalho, também se utilizou biofilme apenas formado por *S. mutans*; mas a melaleuca estava contida em dentifrício comercial. Também esse produto apresentou alguns resultados satisfatórios; todavia, em se tratando de dentifrícios, é importante considerar que, na formulação, pode haver substâncias que interfiram positiva ou negativamente na eficácia da substância natural. Uma outra diferença encontrada foi que Song *et al.* (2020) não avaliaram o potencial da melaleuca para impedir ou reduzir a formação de lesões iniciais de cárie causadas por biofilmes formados diretamente em esmalte dentário; esse método foi aplicado no presente trabalho.

Braga *et al.* (2020) também desenvolveram um estudo para avaliar o efeito de soluções experimentais preparadas a partir de extratos de algumas plantas, dentre elas a camomila, comparados a enxaguatórios bucais comerciais (sendo um à base de malva e o outro convencional, de clorexidina), com relação à formação de biofilme, contagem de UFC, redução de produção de ácido láctico e prevenção de desmineralização, para microrganismos de um biofilme de microcosmo em esmalte dentário. Referente à espessura de biofilme, todas as soluções, com exceção do enxaguante de clorexidina, apresentaram resultados semelhantes ao controle negativo. A solução de camomila não reduziu a produção de ácido, diferindo da clorexidina e do enxaguatório comercial com malva. Da análise de UFC, para *Lactobacillus* sp e estreptococcus totais, a solução de camomila apresentou significativa redução comparada ao controle negativo. Assim como os enxaguatórios de clorexidina e o de malva, a solução de camomila também foi capaz de reduzir a perda mineral integrada do esmalte, a profundidade da lesão e a taxa de perda mineral. Camomila contém, dentre outros, sesquiterpenos, cumarinas, flavonoides como principais constituintes ativos e alfa bisabolol e éteres cíclicos com propriedades antimicrobianas (BRAGA *et al.*, 2020; SINGH *et al.*, 2011). Embora tenha mostrado alguma eficácia no estudo citado, em nossa pesquisa o dentifrício à base de camomila não teve bons resultados de forma geral. Mais uma vez, deve-se considerar a possibilidade de, pelo fato de ter sido utilizada como único componente, em solução, a substância em questão pode gerar resultados bastante diferentes do que se estiver na forma de dentifrício, somada a outros ingredientes, que possivelmente interfiram em sua ação.

Quanto às análises relacionadas ao controle de desmineralização, um dos métodos utilizados foi o de Microdureza Longitudinal com um indentador Knoop, o que permitiu

verificar e mensurar a desmineralização das lesões de cárie por profundidade e também o perfil da perda de dureza (ΔS). Tal método tem sido aplicado em diversos estudos (ALMEIDA *et al.*, 2019; ARGENTA; TABCHOURI; CURY, 2003; VALE *et al.*, 2007). Outra análise utilizada foi a de Microscopia de Luz Polarizada, largamente utilizada para determinar áreas de desmineralização no esmalte, sendo apontada como um método eficaz para a determinação de lesões de subsuperfície (QUITERO *et al.*, 2019).

Com relação à ação dos dentifrícios contra a desmineralização do esmalte dentário, os dados obtidos da análise de microdureza apresentaram um bom desempenho para o dentifrício de melaleuca, que em todas as profundidades mostrou padrões altos de dureza. Os valores do dentifrício fluoretado nas profundidades individualizadas de 10 μm e de 20 μm assemelham-se aos da água destilada, e esse dentifrício somente aumenta o padrão de dureza a partir das profundidades de 20 μm e 30 μm , comparado aos demais. No que diz respeito aos resultados de perda de dureza, valores mais baixos do padrão de ΔS sugerem maior inibição de desmineralização (FERNÁNDEZ *et al.*, 2017), então há semelhança entre os dentifrícios de nim, de melaleuca e o fluoretado, os quais apresentaram resultados melhores do que a água destilada. No entanto, o valor de perda mineral para o dentifrício de camomila foi semelhante à água destilada, e isso contrasta com os resultados do trabalho de Braga *et al.* (2020).

Apesar de os dentifrícios de nim e de melaleuca terem bons resultados quanto à perda de dureza, permitiram maior formação de biofilme do que o dentifrício fluoretado. Talvez isso se explique pelos seus valores de pH mais elevados que os demais produtos testados, o que pode ter neutralizado os ácidos produzidos pelo biofilme, inibindo a desmineralização do esmalte dentário. No estudo realizado por Braga *et al.* (2019), percebeu-se que o dentifrício o qual continha extrato de própolis apresentou limitada prevenção à desmineralização, reduzindo a profundidade da lesão provavelmente pela diminuição da quantidade de ácidos e/ou da penetração desses ácidos no esmalte dentário, o que sugeriu estudos futuros os quais permitam novas abordagens desse mecanismo.

Nas análises qualitativas, as imagens obtidas da análise de Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) evidenciaram que as superfícies de esmalte dos grupos sem tratamento e tratado com dentifrício de camomila sofreram maior perda mineral, e na análise de Microscopia de Luz Polarizada (MLP), verificou-se que todos os grupos apresentaram imagens sugestivas de lesões de subsuperfície, porém estas se mostraram menos espessas em dentifrício fluoretado, dentifrício de nim e dentifrício de melaleuca. O baixo pH do dentifrício de camomila pode ter contribuído para uma maior perda mineral de sua superfície e para uma maior lesão de subsuperfície, o que se percebeu primeiramente na análise de MEV, a qual mostrou a exposição

de prismas de esmalte na superfície dos espécimes tratados com esse produto e posteriormente, na análise de MLP, percebeu-se uma região sugestiva de lesão de subsuperfície mais espessa se comparada aos grupos tratados com dentifrício de fluoreto de estanho, de nim e de melaleuca. Provavelmente os ácidos produzidos pelos microrganismos do biofilme provocaram perda mineral na superfície do esmalte dos espécimes e estes, mesmo quando imersos em seu tratamento, não se submeteram a um meio cujo pH pudesse neutralizar os ácidos produzidos no biofilme e, assim, pudesse reduzir a perda mineral do esmalte.

Dessa forma, percebe-se, pelos resultados das análises realizadas, que apenas o dentifrício de camomila apresentou resultados semelhantes aos do controle negativo, evidenciando que tal produto não demonstrou ação preventiva contra lesões iniciais de cárie.

Ademais, os dentifrícios comerciais convencionais podem contar com alguns ingredientes químicos terapêuticos em suas formulações, os quais desempenham funções específicas e importantes, como os fluoretos, que têm o poder de remineralizar estruturas dentárias as quais sofreram desmineralização, e os antimicrobianos como o TCS. Entretanto, alguns trabalhos têm apontado para efeitos adversos dessas substâncias, e, devido a isso, novos produtos com composição predominantemente natural/herbal têm aparecido no mercado, apresentando ingredientes que sugerem substituir os contraindicados.

O receio da ingestão de flúor advindo do dentifrício por crianças de tenra idade no momento da higiene bucal, podendo ser somado ao que se ingere advindo da água de abastecimento, induziu à produção de dentifrícios sem fluoretos em sua composição. Uma revisão realizada por Wong *et al.* (2010), sobre o momento de se iniciar a escovação com dentifrício fluoretado na infância, mostrou evidências irresolutas para o uso desse produto entre as idades de 12 e 24 meses. Porém, o trabalho de Wright *et al.* (2014) aponta para o uso de dentifrício fluoretado como estratégia para se evitar cárie em todas as idades, apenas tendo o cuidado de observar a quantidade ideal para cada faixa etária. Diante do comprovado controle à cárie promovido pelo íon fluoreto, bem como da detecção de graus muito leve e leve de fluorose associados ao uso regular de dentifrícios e de água de abastecimento fluoretados no controle de cárie na maior parte dos casos, evidencia-se que os dentifrícios fluoretados devem ser utilizados independentemente da faixa etária, desde que em concentração, quantidade e frequência corretas e sob supervisão de um adulto responsável durante a higiene bucal de uma criança (CHEDID; BLANK; CURY, 2017; CURY; TENUTA, 2014; O'MULLANE *et al.*, 2016). Além disso, áreas de opacidade encontradas no esmalte podem ser resultado de outra causa que não a fluorose, devendo haver um diagnóstico criterioso para diferenciar os defeitos encontrados no esmalte (O'MULLANE *et al.*, 2016).

Curiosamente, as análises de microdureza e de MLP do presente estudo não conferiram ao dentifrício fluoretado resultados melhores que o destacassem dos demais produtos testados. Outrossim, uma vez que o uso de fluoretos é considerado o principal motivo para a redução dos índices de cárie na maioria das populações, pois esse íon desempenha um papel crucial no mecanismo de remineralização (GONZÁLEZ-CABEZAS; FERNÁNDEZ, 2018), a literatura tem apontado que a combinação de alguns metais com o íon fluoreto confere efeitos antimicrobianos ao produto, e isso tem gerado interesse no tocante ao manejo da doença cárie (GONZÁLEZ; FERNÁNDEZ, 2018). Diante disso, o presente estudo avaliou o desempenho de dentifrícios herbais comparados a um com fluoreto de estanho e com Lauril Sulfato de Sódio (LSS), que também tem ação antimicrobiana, no controle de lesões iniciais de cárie. A literatura afirma que o fluoreto de estanho apresenta o poder de interferir na formação de biofilme, em razão da presença do íon estanho, ao mesmo tempo que reduz a desmineralização do esmalte (FERNÁNDEZ et al., 2016; GONZÁLEZ; FERNÁNDEZ, 2018). O estanho tem propriedades antimicrobianas e alta afinidade pelas superfícies de apatita (LIPPERT, 2016). Porém, de acordo com Lippert (2016), apesar de a literatura sugerir que o estanho provavelmente precipite na superfície do esmalte dental e crie uma barreira para a difusão dos ácidos produzidos no processo cariioso, também existem evidências as quais apontam para a sua interferência no mecanismo de remineralização, minimizando o efeito do flúor na redistribuição mineral dentro da lesão de subsuperfície (LIPPERT, 2016).

Somado a isso, os ácidos produzidos pelo biofilme estagnado na superfície do esmalte diante de uma dieta rica em alimentos cariogênicos ocasionam aumento da porosidade da subsuperfície mais do que na superfície (FEJERSKOV; NYVARD; KIDD, 2011). Apesar de não haver um completo esclarecimento quanto a isso, sabe-se que as proteínas salivares ricas em prolina e outros inibidores contribuem para que a película adquirida desempenhe um papel de proteção (HAY, 1984), pois previnem a precipitação do fosfato de cálcio na superfície do esmalte e inibem a desmineralização; porém, por serem macromoléculas, possuem uma atuação limitada, uma vez que não conseguem penetrar na subsuperfície do esmalte (FEJERSKOV; NYVARD; KIDD, 2011). Portanto, sugere-se que além de, diante da presença dos ácidos produzidos pelas bactérias do biofilme, as macromoléculas da saliva não conseguirem conferir uma proteção natural à subsuperfície do esmalte, no caso do dentifrício contendo fluoreto de estanho, esse íon metálico pode interferir no mecanismo do fluoreto. Possivelmente essas afirmações justifiquem o fato de, no presente estudo, terem sido observadas as lesões de subsuperfície, ainda que discretas, nos espécimes tratados com o dentifrício fluoretado nas análises de MLP e também responda à dúvida gerada diante dos resultados da análise de

Microdureza Longitudinal, que não mostraram padrões de dureza melhores para tal produto nas profundidades de 10 μm e de 20 μm .

Nessa perspectiva, outros estudos poderiam se desenvolver utilizando biofilmes multiespécies, pois uma das limitações do presente trabalho foi o fato de que os produtos testados *in vitro* não se submeteram às condições reais do ambiente bucal, não contando com biofilmes complexos e estruturados. Além disso, futuros experimentos poderiam testar a eficácia de outros dentifrícios com diversas formulações naturais, a fim de verificar a eficácia das diferentes opções destinadas à higiene bucal existentes no mercado.

8 CONCLUSÃO

Pelos achados obtidos e dentro das limitações deste trabalho, conclui-se que os dentifrícios comerciais à base de produtos naturais de nim e de melaleuca, apesar de apresentarem uma menor inibição à formação de colônias de *S. mutans* em relação ao dentifrício fluoretado, tiveram um resultado melhor do que o controle negativo; além disso, apresentaram, em outras análises, semelhanças com os resultados do dentifrício à base de fluoreto de estanho. Porém, tal afirmação não se aplica ao dentifrício de camomila, o qual exibiu alguns resultados semelhantes aos do controle negativo. Por sua vez, o dentifrício à base de fluoreto de estanho, assim como o controle negativo e os demais tratamentos, também não impediu o surgimento de lesões de subsuperfície.

REFERÊNCIAS

- AGARWAL, P.; NAGESH, L.; MURLIKRISHNAN. Evaluation of the antimicrobial activity of various concentrations of tulsi (*Ocimum sanctum*) extract against *Streptococcus mutans*: an *in vitro* study. **Indian Journal of Dental Research**, v. 21, p. 357-359, 2010.
- ALLAKER, R.P.; DOUGLAS, C.W. Novel anti-microbial therapies for dental plaque-related diseases. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 33, n. 1, p. 8-13, 2009.
- ALLISON, D.G. The biofilm matrix. **Biofouling**, v. 19, p. 139-50, 2003.
- ALMEIDA, F.L.; MARÍN, L.M.; MARTÍNEZ-MIER, E.A.; CURY, J.A. Fluoride dentifrice overcomes the lower resistance of fluorotic enamel to demineralization. **Caries Research**, v. 53, p. 567-575, 2019.
- ANUSHREE, B.; FAWAZ, M.A.; NARAHARI, R.; SHAHELA, T.; SYED, A. Comparison of antimicrobial efficacy of triclosan - containing, herbal and homeopathy toothpastes - an *in vitro* study. **Journal of Clinical and Diagnostic Research**. 2015, v. 9, n. 10, p. DC05-8. doi: 10.7860/JCDR/2015/11984.6626. Epub 2015 Oct 1. PMID: 26557516; PMCID: PMC4625235.
- ARGENTA, R.M.O.; TABCHOURY, C.P.M.; CURY, J.A. A modified pH-cycling model to evaluate fluoride effect on enamel demineralization. **Pesquisa Odontológica Brasileira**, v. 17, n. 3, p. 241-246, 2003.
- BATISTA A.L.; LINS, R.D.; DE SOUZA COELHO, R.; DO NASCIMENTO BARBOSA, D.; MOURA BELÉM, N.; ALVES CELESTINO, F.J. Clinical efficacy analysis of the mouth rinsing with pomegranate and chamomile plant extracts in the gingival bleeding reduction. **Complementary Therapies in Clinical Practice**, 2014; v. 20, n. 1, p. 93-8. doi: 10.1016/j.ctcp.2013.08.002. Epub 2013 Sep 25. PMID: 24439653.
- BHAT, S.S.; HEGDE, S.K.; RATHEESH, M.S. Comparison of antimicrobial potential of various herbal dentifrices. **International Journal of Dental and Medical Research**, v. 1, n. 3, p. 41-45, 2014.
- BOWEN, WH. Do we need to be concerned about dental caries in the coming millennium? **Crit Rev Oral Biol Med**, v. 13, n. 2, p. 126–131. 2002.
- BOWEN, W.H.; KOO, H. Biology of *Streptococcus mutans*-derived glucosyltransferases: role in extracellular matrix formation of cariogenic biofilms. **Caries Research**, v. 45, p. 69–86, 2011.
- BOWEN, W. H. Dental caries – not just holes in teeth! A perspective. **Molecular Oral Microbiology**, v. 31, n. 1, p. 228–233, 2015.
- BRAGA, A.S.; GIROTTI, L.D.; DE MELO SIMAS, LL.; PIRES, J.G.; PELÁ, V.T.; BUZALAF, M.A.R.; MAGALHÃES, A.C. Effect of commercial herbal toothpastes and mouth rinses on the prevention of enamel demineralization using a microcosm biofilm

model. **Biofouling**, v. 3, n. 7, p. 796-804, 2019. doi: 10.1080/08927014.2019.1662897. Epub 2019 Sep 13. PMID: 31514534.

BRAGA, A.S.; SIMAS, L.L.M.; PIRES, J.G.; SOUZA, B.M.; DE MELO, F.P.S.R.; SALDANHA, L.L.; DOKKEDAL, A.L.; MAGALHÃES, A.C. Antibiofilm and anti-caries effects of an experimental mouth rinse containing *Matricaria chamomilla* L. extract under microcosm biofilm on enamel. **Journal of Dentistry**, v. 99: 103415, 2020. doi: 10.1016/j.jdent.2020.103415. Epub 2020 Jun 24. PMID: 32592827.

CHEDID, S.J.; BLANK, D.; CURY, J.A. Higiene bucal usando fluoretos – medidas de prevenção. In: BURNS, D.A.R.; *et al.* **Tratado de pediatria**. 4ª ed., seção 28, cap. 3, 2017.

CHINSEMBU, K.C. Plants and other natural products used in the management of oral infections and improvement of oral health. **Acta Tropica**, v. 154, p. 6-18, 2015. doi: 10.1016/j.actatropica.2015.10.019. Epub 2015 Oct 29. PMID: 26522671.

CONRADS, G.; ABOUT, I. Pathophysiology of dental caries. **Monographs in Oral Science**, v. 27, p. 1-10, 2018.

CURY, J.A.; TENUTA, L.M.; RIBEIRO, C.C.; PAES LEME, A.F. The importance of fluoride dentifrices to the current dental caries prevalence in Brazil. **Brazilian Dental Journal**, v. 15, p. 167-174, 2004.

CURY, J. A.; TENUTA, L. M. Enamel remineralization: controlling the caries disease or treating early caries lesions? **Brazilian Oral Research**, v. 23, (Suppl 1), p. 23–30, 2009.

CURY, J.A; TENUTA, L.M. Evidence-based recommendation on toothpaste use. **Brazilian Oral Research**, v. 28, Spec No:1-7, 2014. doi: 10.1590/S1806-83242014.50000001. Epub 2014 Jan 24. PMID: 24554097.

CURY, J. A.; DE OLIVEIRA, B. H.; DOS SANTOS, A. P. P.; TENUTA, L. M. A. Are fluoride releasing dental materials clinically effective on caries control? **Dental Materials**, v. 32, n. 3, p. 323–333, 2016.

DAWES, C. Fluorides: mechanisms of action and recommendations for use. **Journal Canadian Dental Association**, v. 55, n. 9, p. 721-3, 1989. PMID: 2676116.

DIBDIN, G.H.; SHELLIS, R.P. Physical and biochemical studies of *Streptococcus mutans* sediments suggest new factors linking the cariogenicity of plaque with its extracellular polysaccharide content. **Journal of Dental Research**, v. 67, n. 6, p. 890-5, 1988.

DUARTE, S.; GREGOIRE, S.; SINGH, A. P.; VORSA, N.; SCHAICH, K.; BOWEN, W. H.; KOO, H. Inhibitory effects of cranberry polyphenols on formation and acidogenicity of *Streptococcus mutans* biofilms. **FEMS Microbiology Letters**, v. 257, n. 1, p. 50-56, 2006.

DUARTE, S.; KLEIN, M.I.; AIRES, C.P.; CURY, J.A.; BOWEN, W.H.; KOO, H. Influences of starch and sucrose on *Streptococcus mutans* biofilms. **Oral Microbiology and Immunology**, v. 23, p. 206–212, 2008. <https://doi.org/10.1111/j.1399-302X.2007.00412.x>.

FANI, M.M.; KOHANTEB, J. Inhibitory activity of Aloe vera gel on some clinically isolated cariogenic and periodontopathic bacteria. **Journal of Oral Science**, v. 54, p. 15-21, 2012.

FEATHERSTONE, J. D. Prevention and reversal of dental caries: role of low-level fluoride. **Community Dentistry and Oral Epidemiology**, v. 27, n. 1, p.31–40, 1999.

FEATHERSTONE, J.D. The science and practice of caries prevention. **Journal of the American Dental Association**, v. 131, n. 7, p. 887-99, 2000 doi: 10.14219/jada.archive.2000.0307. PMID: 10916327.

FEJERSKOV, O.; NYVARD, B.; KIDD, E.A.M. Patologia da cárie dentária. *In*: FEJERSKOV, O.; KIDD, E. A. M. **Cárie dentária: a doença e seu tratamento clínico**. 2ª ed. Oxford. Blackwell Munksgaard, p 20-48, 2011

FEJERSKOV, O.; LARSEN, M.J. Demineralization and remineralisation: the key to understanding clinical manifestations of dental caries. *In*: FEJERSKOV, O.; NYVAD, B.; KIDD, E, editors. **Dental caries: the disease and its clinical management**. 3rd ed. Oxford (UK): Wiley Blackwell. p. 160–169, 2015.

FERNÁNDEZ, C.E.; FONTANA, M.; SAMARIAN. D.; CURY, J.A.; RICKARD, A.H.; GONZÁLEZ-CABEZAS, C. Effect of fluoride-containing toothpastes on enamel demineralization and Streptococcus mutans biofilm architecture. **Caries Research**, v. 50, n. 2, p. 151-8, 2016. doi: 10.1159/000444888. Epub 2016 Apr 14. PMID: 27073873.

FERNÁNDEZ, C.E.; TENUTA, L.M.A.; DEL BEL CURY, A.A.; NÓBREGA, D.F.; CURY, J.A. Effect of 5,000 ppm fluoride dentifrice or 1,100 ppm fluoride dentifrice combined with acidulated phosphate fluoride on caries lesion inhibition and repair. **Caries Research**, v. 51, n.3, p. 179-187, 2017. doi: 10.1159/000453624. Epub 2017 Feb 22. PMID: 28222429.

FIORILLO, L.; CERVINO, G.; HERFORD, A.S.; LAINO, L.; CICCÌ, M. Stannous fluoride effects on enamel: a systematic review. **Biomimetics** (Basel), v. 5, n. 3, p.41, 2020. doi: 10.3390/biomimetics5030041. PMID: 32878006; PMCID: PMC7559150.

FREIRES, I.A.; ROSALEN, P.L. How natural product research has contributed to oral care product development? A critical view. **Pharmaceutical Research**, v. 33, n. 6, p. 1311-7, 2016.

GBD Disease and Injury Incidence and Prevalence Collaborators, 2016. Global, regional, and national incidence, prevalence, and years lived with disability for 328 diseases and injuries for 195 countries, 1990-2016: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2016. **Lancet**. 2017, v. 390, n. 10100, p. 1211-1259. doi: 10.1016/S0140-6736(17)32154-2. Erratum in: **Lancet**. 2017, v. 390, n. 10106, p. e38. PMID: 28919117; PMCID: PMC5605509.

GEORGE, S.S.; SHETTY, A.; HEGDE, A. Assessment of antifungal properties of crude neem extract versus neem mouthwash – An in vitro study. **IOSR Journal of Dental and Medical Sciences**, v. 15, p. 101–5, 2016.

GONZÁLEZ-CABEZAS, C.; FERNÁNDEZ, C.E. Recent advances in remineralization therapies for caries lesions. **Advances in Dental Research**, v. 29, n. 1, p. 55-59, 2018. doi: 10.1177/0022034517740124. PMID: 29355426.

HANNIG, C.; HANNIG, M.; ATTIN, T. Enzymes in the acquired enamel pellicle. **European Journal of Oral Sciences**, v. 113, n. 1, p. 2-13, 2005.

HART, P.H.; BRAND, C.; CARSON, C.F.; RILEY, T.V.; PRAGER, R.H.; FINLAY-JONES, J.J. Terpinen-4-ol, the main component of the essential oil of *Melaleuca alternifolia* (tea tree oil), suppresses inflammatory mediator production by activated human monocytes. **Inflammation Research**, v. 49, p. 619–626, 2000. doi:10.1007/s000110050639

HAY, D.I. Specific functional salivary protein. *In*: GUGGENHEIM, B., ed. **Cariology today**. Basel: Karger, 1984, 98 – 108.

HEALY, C.M.; PATERSON, M.; JOYSTON-BECHAL, S.; WILLIAMS, D.M.; THORNHILL, M.H. The effect of a sodium lauryl sulfate-free dentifrice on patients with recurrent oral ulceration. **Oral Diseases**, v. 5, n.1, p: 39–43, 1999.

HOJO, K.; NAGAOKA, S.; OHSHIMA, T.; MAEDA, N. Bacterial interactions in dental biofilm development. **Journal of Dental Research**, v. 88, n. 11, p. 982-90, 2009.

HOOGENDOORN, H.; SCHOLTES, W. Influence of the activation of the lactoperoxidase system in saliva on the initiation of caries and chronic, recurrent aphthes. **Nederlands tijdschrift voortandheelkunde**, v. 86, n. 1, p: 36–39, 1979.

HOU, Q.; MAHNKEN, J.D.; GAJEWSKI, B.J.; DUNTON, N. The Box-Cox power transformation on nursing sensitive indicators: does it matter if structural effects are omitted during the estimation of the transformation parameter? **BMC Medical Research Methodology**, v. 11, p. 118, 2011. doi: 10.1186/1471-2288-11-118. PMID: 21854614; PMCID: PMC3201036.

KARATAN, E.; WATNICK, P. Signals, regulatory networks, and materials that build and break bacterial biofilms. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 73, n. 2, p. 310-47, 2009.

KOLENBRANDER, P. E.; PALMER, R. J.; PERIASAMY, S.; JAKUBOVICS, N. S. Oral multispecies biofilm development. **Nature Publishing Group**, v. 8, n. 7, p. 471–480, 2010. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1038/nrmicro2381>>.

KOUIDHI, B.; AL QURASHI, Y.M.; CHAIEB, K. Drug resistance of bacterial dental biofilm and the potential use of natural compounds as alternative for prevention and treatment. **Microbial Pathogenesis**, v. 80, p. 39-49, 2015.

KURAMITSU, H.K.; HE, X.; LUX, R.; ANDERSON, M.H.; SHI, W. Interspecies interactions within oral microbial communities. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 71, n. 4, p. 653-70, 2007.

LEE, S.S.; ZHANG, W.; LI, Y. The antimicrobial potential of 14 natural herbal dentifrices: Results of an in vitro diffusion method study. **Journal of the American Dental Association**, v. 135, n. 8, p. 1133-1141, 2004.

LEMOS, JA.; BURNE, RA. A model of efficiency: stress tolerance by *Streptococcus mutans*. **Microbiology**, v. 154, p. 3247–3255, 2008 [PubMed: 18957579]

LEMOS, J.A.; PALMER, S.R.; ZENG, L.; WEN, Z.T.; KAJFASZ, J.K.; FREIRES, I.A.; ABRANCHES, J.; BRADY, L.J. The biology of *Streptococcus mutans*. **Microbiology Spectrum**, v. 7, n. 1, p. 1-26, 2019. DOI: 10.1128/microbiolspec. 2019. GPP3-0051-2018.

LIMA, R.A.; DE SOUZA, S.L.X.; LIMA, L.A.; BATISTA, A.L.X.; DE ARAÚJO, J.T.C.; SOUSA, F.F.O.; ROLIM, J.P.M.L.; BANDEIRA, T.D.J.P.G. Antimicrobial effect of anacardic acid-loaded zein nanoparticles loaded on *Streptococcus mutans* biofilms. **Brazilian Journal of Microbiology**, v.51, n. 4, p. 1623-1630, 2020.

LIPPERT, F. Mechanistic observations on the role of the stannous ion in caries lesion de- and remineralization. **Caries Research**, v. 50, n. 4, p. 378-82, 2016. doi: 10.1159/000446849. Epub 2016 Jul 1. PMID: 27359362.

MALVANIA, E.A.; SHARMA, A.S.; SHETH, S.A.; RATHOD, S.; CHOVIATIA, N.R.; KACHWALA, M.S. *In Vitro* analysis of licorice (*Glycyrrhiza glabra*) root extract activity on *Streptococcus mutans* in comparison to chlorhexidine and fluoride mouthwash. **The Journal of Contemporary Dental Practice**, v. 20, n. 12, p. 1389-1394, 2019. PMID: 32381838.

MANARELLI, M.M.; DELBEM, A.C.; LIMA, T.M.; CASTILHO, F.C.; PESSAN, J.P. *In vitro* remineralizing effect of fluoride varnishes containing sodium trimetaphosphate. **Caries Research**, v. 48, n. 4, p. 299-305, 2014. <https://doi.org/10.1159/000356308>

MARINHO, V. C.; HIGGINS, J. P.; SHEIHAM, A.; LOGAN, S. Combinations of topical fluoride (toothpastes, mouthrinses, gels, varnishes) versus single topical fluoride for preventing dental caries in children and adolescents. **Cochrane Database of Systematic Review**, v. 2004, n. 1, 2004. Art. No.: CD002781, 2004.

MARSH, P.D. Host defenses and microbial homeostasis: role of microbial interactions. **Journal of Dental Research**, v. 68, Special issue, p. 1567-75, 1989.

MARSH, P.D.; MARTIN, M.V. Oral microbiology. 5th edition. Edinburgh (UK): Churchill Livingstone; 2009.

MARSH, P. D. Microbiology of Dental Plaque Biofilms and Their Role in Oral Health and caries. **Dental Clinics of NA**, v. 54, n. 3, p. 441–454, 2010. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.cden.2010.03.002>>.

MOON, S.E., KIM, H.Y., CHA, J.D. Synergistic effect between clove oil and its major compounds and antibiotics against oral bacteria. **Archives of Oral Biology**, v. 56, n. 9, p. 907-916, 2011.

NAROTZKI, B., REZNICK, A.Z., AIZENBUD, D., LEVY, Y. Green tea: A promising natural product in oral health. **Archives of Oral Biology**, v. 57, n. 5, p. 429-435, 2012.

NEWBRUN, E. Sucrose, the arch criminal of dental caries. **Odontologisk Revy**, v. 18, n. 4, p. 373-86, 1967. PMID: 5234965.

NOGUEIRA, M.N.; AQUINO, S.G.; ROSSA JUNIOR, C.; SPOLIDORIO, D.M. Terpinen-4-ol and alpha-terpineol (tea tree oil components) inhibit the production of IL-1 β , IL-6 and IL-10 on human macrophages. **Inflammation Research**, v. 63, p. 769–778, 2014. doi:10.1007/s00011-014-0749-x

O’MULLANE, D.M., BAEZ, R.J., JONES, S., LENNON, M.A., PETERSEN, M.E., RUGG-GUN, A.J., WHELTON, H., WHITFORD, G.M. Fluoride and oral health. **Community Dental Health**, v. 33, p. 69-99, 2016.

PAES LEME, A.F.; KOO, H.; BELLATO, C.M.; BEDI, G.; CURY, J.A. The role of sucrose in cariogenic dental biofilm formation—new insight. **Journal of Dental Research**, v. 85, p. 878-887, 2006.

PALOMBO, E.A. Traditional medicinal plant extracts and natural products with activity against oral bacteria: potential application in the prevention and treatment of oral diseases. **Evidence-based Complementary and Alternative Medicine: eCAM**, v. 2011, p. 1-15, 2011. 680354.

PANARIELLO, B.H.D.; AZABI, A.A.; MOKEEM, L.S.; ALMADY, F.A.; LIPPERT, F.; HARA, A.T.; DUARTE, S. The effects of charcoal dentifrices on *Streptococcus mutans* biofilm development and enamel demineralization. **American Journal of Dentistry**, v. 33, n. 1, p. 12-16, 2020.

PANNUTI, C.M.; MATTOS, J.P.; RANOYA, P.N.; JESUS, A.M.; LOTUFO, R.F.M.; ROMITO, G.A. Clinical effect of a herbal dentifrice on the control of plaque and gingivitis. A double-blind study. **Pesquisa Odontológica Brasileira**, v. 17, n. 4, p. 314-8, 2003.

PARK, Y. D.; JANG, J. H.; PARK, J. E.; KIM, J. H.; KIM, E. C.; SONG, Y. J.; KWON, H. J. Analysis of parabens in dentifrices and the oral cavity. **Biomedical Chromatography**, v. 28, n. 12, p. 1692-1700, 2014.

PERES, M.A.; MACPHERSON, L.M.D.; WEYANT, R.J.; DALY, B.; VENTURELLI, R.; MATHUR, M.R.; LISTL, S.; CELESTE, R.K.; GUARNIZO-HERREÑO, C.C.; KEARNS, C.; BENZIAN, H.; ALLISON, P.; WATT, R.G. Oral diseases: a global public health challenge. **Lancet**, v. 394, n. 10194, p. 249-260, 2019. doi: 10.1016/S0140-6736(19)31146-8. Erratum in: **Lancet**. 2019 Sep 21;394(10203):1010. PMID: 31327369.

QUITERO, M.F.Z.; SIRIANI, L.K.; AZEVEDO, C.S.; FREITAS, A.Z.; SCARAMUCCI, T.; SIMIONATO, M.R.L.; MATOS, A.B. Optical coherence tomography and polarized light microscopy for the evaluation of artificial caries: a preliminary study. **General Dentistry**, v. 67, n. 1, p. e1-e6, 2019. PMID: 30644838.

- RANDALL, J.P.; SEOW, W.K.; WALSH, L.J. Antibacterial activity of fluoride compounds and herbal toothpastes on *Streptococcus mutans*: an in vitro study. **Australian Dental Journal**, v. 60, n. 3, p. 368-74, 2015. doi: 10.1111/adj.12247. PMID: 25348354.
- RIVERO-CRUZ, J.F., ZHU, M., KINGHORN, A.D., WU, C.D. Antimicrobial constituents of Thompson seedless raisins (*Vitis vinifera*) against selected oral pathogens. **Phytochemistry Letters**, v. 1, n. 3, p. 151-154, 2008.
- SALIASI, I.; LLODRA, J. C.; BRAVO, M.; TRAMINI, P.; DUSSART, C.; VIENNOT, S.; CARROUEL, F. Effect of a Toothpaste/Mouthwash Containing Carica papaya Leaf Extract on Interdental Gingival Bleeding: A Randomized Controlled Trial. **International Journal of Environmental Research and Public Health**, v. 15, n. 12, p. 1-16, 2018.
- SÄLZER, S.; ROSEMA, N. A. M.; MARTIN, E. C. J.; SLOT, D. E.; TIMMER, C. J.; DÖRFER, C. E.; VAN DER WEIJDEN, G. A. The effectiveness of dentifrices without and with sodium lauryl sulfate on plaque, gingivitis and gingival abrasion— a randomized clinical trial. **Clinical Oral Investigations**, v.20, p. 443–450, 2016.
- SCOTT, D.C.; COGGAN, J.W.; CRUZE, C.A.; HE, T.; JOHNSON, R.D. Topical oral cavity pharmacokinetic modeling of a stannous fluoride dentifrice: an unusual two compartment model. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 98, p. 3862–3870, 2009.
- SHEEN, S.; PONTEFRACT, H.; MORAN, J. The benefits of toothpaste: real or imagined? The effectiveness of toothpaste in the control of plaque, gingivitis, periodontitis, calculus and oral malodour. **Dental Update**, v. 28, n. 3, p. 144–7, 2001.
- SHIM, Y. J.; CHOI, J. H.; AHN, H. J.; KWON, J. S. Effect of sodium lauryl sulfate on recurrent aphthous stomatitis: a randomized controlled clinical trial. **Oral Diseases**, v.18, n. 7, p.655–660, 2012.
- SIEGEL, I.A.; GORDON, H.P. Surfactant-induced alterations of permeability of rabbit oral mucosa in vitro. **Experimental and Molecular Pathology**, v. 44, n. 2, p. 132– 137, 1986.
- SINGH O, KHANAM Z, MISRA N, SRIVASTAVA MK. Chamomile (*Matricaria chamomilla* L.): An overview. **Pharmacognosy Reviews**, v. 5, n. 9, p. 82-95, 2011. doi: 10.4103/0973-7847.79103. PMID: 22096322; PMCID: PMC3210003.
- SONG, Y.M.; ZHOU, H.Y.; WU, Y.; WANG, J.; LIU, Q.; MEI, Y.F. In vitro evaluation of the antibacterial properties of tea tree oil on planktonic and biofilm-forming *Streptococcus mutans*. **AAPS Pharm Sci Tech**, v. 21, n. 227, p. 1-12, 2020. doi: 10.1208/s12249-020-01753-6. PMID: 32767025.
- SOUSA, R.P.; ZANIN, I.C.; LIMA, J.P.; VASCONCELOS, S.M.; MELO, M.A.; BELTRÃO, H.C.; RODRIGUES, L.K. In situ effects of restorative materials on dental biofilm and enamel demineralisation. **Journal of Dentistry**, v. 37, n. 1, p. 44-51, 2009. doi: 10.1016/j.jdent.2008.08.009. Epub 2008 Nov 20. PMID: 19026481.
- STOODLEY, P.; SAUER, K.; DAVIES, D.G.; COSTERTON, J.W. Biofilms as complex differentiated communities. **Annual Review of Microbiology**, v. 56, p. 187-209, 2002.

- TEN CATE, J.M.; LARSEN, M.J.; PEARCE, E.I.F.; FEJERSKOV, O. Interações químicas entre os dentes e os fluidos bucais. *In*: FEJERSKOV, O.; KIDD, E. A. M. **Cárie dentária: a doença e seu tratamento clínico**. 2ª ed. Oxford. Blackwell Munksgaard, p 209-231, 2011.
- TENUTA, L.M.; CERZETTI, R.V.; DEL BEL CURY, A.A.; TABCHOURY, C.P.; CURY, J.A. Fluoride release from CaF₂ and enamel demineralization. **Journal of Dental Research**, v. 87, n. 11, p. 1032-1036, 2008.
- TENUTA, L.M.A.; CURY, J.A. Fluoride: its role in dentistry. **Brazilian Oral Research**, v. 24, n. 1, p. 9–17, 2010.
- VALE, G.C.; TABCHOURY, C.P.; ARTHUR, R.A.; DEL BEL CURY, A.A.; PAES LEME, A.F.; CURY, J.A. Temporal relationship between sucrose-associated changes in dental biofilm composition and enamel demineralization. **Caries Research**, v. 41, p. 406-412, 2007.
- VAN HOUTE, J.; RUSSO, J.; PROSTAK, K.S. Increased pH lowering ability of *Streptococcus mutans* cell masses associated with extracellular glucan-rich matrix material and the mechanisms involved. **Journal of Dental Research**, v. 68, n. 3, p. 451-9, 1989.
- VITT, A.; SOFRATA, A.; SLIZEN, V.; SUGARS, R.V.; GUSTAFSSON, A.; GUDKOVA, E.I.; KAZEKO, L.A.; RAMBERG, P.; BUHLIN, K. Antimicrobial activity of polyhexamethylene guanidine phosphate in comparison to chlorhexidine using the quantitative suspension method. **Annals of Clinical Microbiology and Antimicrobials**, v. 14, p. 36, 2015. doi: 10.1186/s12941-015-0097-x. PMID: 26182984; PMCID: PMC4504446.
- VU, B.; CHEN, M.; CRAWFORD, R.J.; IVANOVA, E.P. Bacterial extracellular polysaccharides involved in biofilm formation. **Molecules**, v. 14, n. 7, p. 2535-54, 2009.
- WEATHERLY, L.M.; GOSSE, J. A. Triclosan exposure, transformation, and human health effects. **Journal of Toxicology and Environmental Health. Part B, Critical Reviews**, v. 20, n. 8, p. 447–469, 2017.
- WHITTAKER, C.J.; KLIER, C.M.; KOLENBRANDER, P.E. Mechanisms of adhesion by oral bacteria. **Annual Review of Microbiology**, v. 50, p. 513–52, 1996.
- WIWATTANARATTANABUT, K.; CHOONHARUANGDEJ, S.; SRITHAVAJ, T. *In vitro* anti-cariogenic plaque effects of essential oils extracted from culinary herbs. **Journal of Clinical and Diagnostic Research**, v. 11, n. 9, p. DC30-DC35, 2017. doi: 10.7860/JCDR/2017/28327.10668. Epub 2017 Sep 1. PMID: 29207708; PMCID: PMC5713730.
- WOLINSKY, L.E.; MANIA, S.; NACHNANI, S.; LING, S. The inhibiting effect of aqueous *Azadirachta indica* (neem) extract upon bacterial properties influencing in vitro plaque formation. **Journal of Dental Research**, v. 75, p. 816-822, 1996.

WONG, M.C.; GLENNY, A.M.; TSANG, B.W.; LO, E.C.; WORTHINGTON, H.V.; MARINHO, V.C. Topical fluoride as a cause of dental fluorosis in children. **The Cochrane Database of Systematic Reviews**, v. 2010, Issue 1, 2010. Art. No.: CD007693. DOI: 10.1002/14651858.CD007693.pub2. 2010.

WRIGHT, J.T.; HANSON, N.; RISTIC, H.; WHALL, C.W.; ESTRICH, C.G.; ZENTZ, R.R. Fluoride toothpaste efficacy and safety in children younger than 6 years: a systematic review. **Journal of the American Dental Association**, v. 145, p. 182-189, 2014.

ZENG, L.; BURNE, RA. Comprehensive mutational analysis of sucrose-metabolizing pathways in *Streptococcus mutans* reveals novel roles for the sucrose phosphotransferase system permease. **Journal of Bacteriology**, v. 195, p. 833–843, 2013. [PubMed: 23222725]

ANEXO A – COMPROVANTE DO PARECER CONSUBSTANCIADO DO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA

UFC - UNIVERSIDADE
FEDERAL DO CEARÁ /



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: DENTIFRÍCIOS À BASE DE PRODUTOS NATURAIS: POTENCIAIS ANTICÁRIE E ANTIEROSIVO/ANTIABRASIVO - ESTUDO IN VITRO

Pesquisador: GABRIELA DE ALBUQUERQUE ALMEIDA FIGUEREDO

Área Temática:

Versão: 1

CAAE: 27985119.4.0000.5054

Instituição Proponente: Departamento de Clínica Odontológica

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 3.834.495

Apresentação do Projeto:

Estudo do tipo in vitro para a investigação da eficácia anti cárie dos dentífricos. Na etapa I (eficácia) serão realizados testes de formação de biofilme em blocos de esmalte humano com o uso da saliva de participantes saudáveis. Na etapa II controle de erosão e abrasão dos dentífricos utilizando os blocos de esmalte avaliado pelo MEV.

Objetivo da Pesquisa:

Objetivo Geral: Avaliar o efeito in vitro de dentífricos à base de ingredientes naturais no controle de lesões iniciais de cárie e do processo erosivo/abrasivo em esmalte humano em ensaio in vitro.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Riscos:

Quanto aos riscos envolvidos nesta pesquisa, existe risco mínimo de danos dos participantes, em que não se realiza nenhuma intervenção ou modificação intencional nas variáveis fisiológicas ou psicológicas e sociais dos indivíduos que participam do estudo, nem invasivo à intimidade do indivíduo, uma vez que utilizará dentes humanos extraídos e saliva humana, ambos sem identificação.

Benefícios:

Endereço: Rua Cel. Nunes de Melo, 1000

Bairro: Rodolfo Teófilo

CEP: 60.430-275

UF: CE

Município: FORTALEZA

Telefone: (85)3368-8344

E-mail: comape@ufc.br

Continuação do Parecer: 3.034.495

Este estudo permitirá determinação, dentre os dentífricos comerciais à base de produtos naturais, os que apresentam maior controle da formação de biofilme oral, bem como das lesões de erosão de origem extrínseca associadas à abrasão.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Esse estudo é relevante considerando que evidências sugerem que o triclosan, lauril sulfato de sódio (LSS), parabenos e flúor podem representar um risco para a saúde humana, mas a literatura ainda carece de estudos que confirmem esse achado.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Todos os termos foram devidamente apresentados.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Não se aplica.

Considerações Finais a critério do CEP:

A pesquisadora deve enviar o relatório final a este CEP ao concluir a pesquisa.

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PI_INFORMAÇÕES_BASICAS_DO_PROJETO_1487643.pdf	20/12/2019 20:45:51		Acelto
Outros	FIEL_DEPOSITARIO.pdf	20/12/2019 20:27:24	GABRIELA DE ALBUQUERQUE ALMEIDA FIGUEREDO	Acelto
Outros	carta_apreciacao.pdf	20/12/2019 12:04:51	GABRIELA DE ALBUQUERQUE ALMEIDA FIGUEREDO	Acelto
Folha de Rosto	FOLHA_ROSTO.pdf	20/12/2019 12:03:34	GABRIELA DE ALBUQUERQUE ALMEIDA FIGUEREDO	Acelto
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLE.pdf	20/12/2019 12:03:03	GABRIELA DE ALBUQUERQUE ALMEIDA FIGUEREDO	Acelto
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	PROJETO_DEFINITIVO.pdf	20/12/2019 11:51:58	GABRIELA DE ALBUQUERQUE ALMEIDA	Acelto

Endereço: Rua Cel. Nunes de Melo, 1000

Bairro: Rodolfo Teófilo

CEP: 80.430-275

UF: CE

Município: FORTALEZA

Telefone: (85)5366-8344

E-mail: comape@ufc.br

UFC - UNIVERSIDADE
FEDERAL DO CEARÁ /



Continuação do Parecer: 3.034.495

Projeto Detalhado / Brochura Investigador	PROJETO_DEFINITIVO.pdf	20/12/2019 11:51:58	FIGUEREDO	Aceito
Declaração de Instituição e Infraestrutura	Autorizacao_Institucional_Realizacao_Projeto.pdf	20/12/2019 11:51:31	GABRIELA DE ALBUQUERQUE ALMEIDA FIGUEREDO	Aceito
Outros	termoentes.pdf	10/12/2019 17:03:56	GABRIELA DE ALBUQUERQUE ALMEIDA FIGUEREDO	Aceito
Cronograma	cronogramagabi2019.pdf	10/12/2019 17:03:17	GABRIELA DE ALBUQUERQUE ALMEIDA FIGUEREDO	Aceito
Orçamento	orcamentogabi2019.pdf	10/12/2019 17:02:48	GABRIELA DE ALBUQUERQUE ALMEIDA FIGUEREDO	Aceito

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

FORTALEZA, 12 de Fevereiro de 2020

Assinado por:

FERNANDO ANTONIO FROTA BEZERRA
(Coordenador(a))

Endereço: Rua Cel. Nunes de Melo, 1000

Bairro: Rodolfo Teófilo

CEP: 60.430-275

UF: CE Município: FORTALEZA

Telefone: (85)3368-3344

E-mail: conep@ufc.br