

**UNIVERSIDADE DE UBERABA  
CURSO DE ODONTOLOGIA**

**AILA PEREIRA CARDOSO**

**ANÁLISE DO PH E DA EFETIVIDADE ANTIMICROBIANA DE  
ANTISSÉPTICOS BUCAIS À BASE DE PRODUTOS NATURAIS E  
CLOREXIDINA**

**UBERABA-MG  
2020**

**AILA PEREIRA CARDOSO**

**ANÁLISE DO PH E DA EFETIVIDADE ANTIMICROBIANA DE  
ANTISSÉPTICOS BUCAIS À BASE DE PRODUTOS NATURAIS E  
CLOREXIDINA**

Trabalho de Conclusão de Curso, apresentado ao curso de graduação de Odontologia da Universidade de Uberaba, como requisito parcial para obtenção do título de cirurgião- dentista.

Área de concentração: Materiais Dentários

Orientadora: Profa. Dra. Denise Tornavoi de Castro

**UBERABA-MG  
2020**

**AILA PEREIRA CARDOSO**

**ANÁLISE DO PH E DA EFETIVIDADE ANTIMICROBIANA DE  
ANTISSÉPTICOS BUCAIS À BASE DE PRODUTOS NATURAIS E  
CLOREXIDINA**

Trabalho de Conclusão de Curso,  
apresentado ao curso de graduação de  
Odontologia da Universidade de Uberaba,  
como requisito parcial para obtenção do  
título de cirurgião- dentista.

Área de concentração: Materiais Dentários

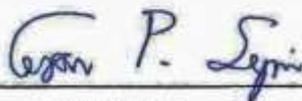
Orientadora: Profa. Dra. Denise Tornavoi de Castro

Aprovado em: 09/12/2020

Banca Examinadora



Prof. Dra. Denise Tornavoi de Castro- orientadora  
Uniuibe



Professor  
Uniuibe

## AGRADECIMENTOS

Em primeiro lugar agradeço, a Deus, pela minha vida e por me permitir ultrapassar todos os obstáculos encontrados.

A Universidade de Uberaba, ao corpo docente, direção e administração que oportunizaram a janela que hoje vislumbro um horizonte superior.

Aos meus pais Wesley e Soralha que me incentivaram nos momentos difíceis e compreenderam a minha ausência enquanto eu me dedicava para a realização desse sonho e ao meu irmão Wolrick por todo carinho e companheirismo durante esse período.

Ao meu avô Alcedico e minha avó Olímpia (*in memoriam*), que me fizeram descobrir minha vocação para a área da saúde e me ensinaram a ter coragem diante das adversidades da vida.

Aos meus professores por todo ensinamento, conselhos e paciência que me guiaram e contribuíram para o meu aprendizado, em especial a minha orientadora Denise Tornavoi pelas correções, ensinamentos e amizade que permitiram apresentar um melhor desempenho no meu processo de formação

E aos meus colegas de turma, com quem convivi intensamente durante os últimos anos, onde compartilhamos momentos de descobertas e aprendizado.

## RESUMO

A formulação e uso de antissépticos bucais com produtos naturais está em expansão devido às mudanças nos padrões de consumo consciente e sustentável, bem como a segurança do paciente e do meio ambiente. O objetivo deste estudo foi avaliar o pH e as atividades antibacteriana e antibiofilme de antissépticos formulados com *Malva sylvestris* (Malvatricin Plus<sup>®</sup>) ou própolis (Proporalcare<sup>®</sup>). Como controle-positivo e controle-negativo, com e sem atividades antibacteriana e antibiofilme, empregou-se a clorexidina (PerioGard<sup>®</sup>) e a solução salina a 0,85%, respectivamente. A mensuração do pH de uma amostra de 12 mL de cada antisséptico foi determinada por meio de pHmetro. Ainda, a técnica de difusão em camada dupla de ágar foi utilizada para determinar a atividade antibacteriana dos antissépticos contra as cepas padrão: *Streptococcus mutans* (ATCC 25175) e *Streptococcus sobrinus* (ATCC 27607). Com relação a atividade antibiofilme, um total de 72 espécimes de dentes bovinos (2x5x5mm) foram utilizados para formação de biofilme com as cepas padrão de *S. mutans* e *S. sobrinus* a 37°C por 24h, em microaerofilia, e sob agitação orbital. Decorrido esse período, as amostras foram divididas de forma aleatória em 4 grupos (n=9) conforme os diferentes tratamentos: G1-controle-negativo (solução salina a 0,85% em contato com os biofilmes por 1min); G2-Malvatricin Plus<sup>®</sup> em contato com os biofilmes por 1min; G3-Proporalcare<sup>®</sup> em contato com os biofilmes por 1min e G4-controle-positivo (PerioGard<sup>®</sup> em contato com os biofilmes por 1min). Após os tratamentos, as amostras foram transferidas para microtubos contendo 1mL de caldo Lethen e pérolas de vidro, homogeneizadas, diluídas e alíquotas semeadas na superfície de placas de Petri com SB20. A carga bacteriana presente nos biofilmes foi determinada após incubação a 37°C por 48h de incubação em microaerofilia. Os resultados da análise microbiológica foram comparados e avaliados pelo teste de Kruskal-Wallis seguido pelo pós-teste de Dunn ( $\alpha=0,05$ ). Os antissépticos do G2 e G4 apresentaram pH ácido de 6,60 e 5,72, respectivamente e do G3 pH alcalino (7,6). A atividade antibacteriana dos antissépticos com G2 e G4 foram estatisticamente semelhantes entre si contra *S. mutans* ( $p=0,313$ ) e *S. sobrinus* ( $p=0,310$ ), e diferentes entre os demais grupos ( $p<0,05$ ), que não apresentaram atividade. Acerca da atividade antibiofilme, houve diferença estatisticamente significativa entre o G1 e o antisséptico do G4 contra *S. mutans* ( $p=0,034$ ) e *S. sobrinus* ( $p=0,009$ ), sendo que os antissépticos formulados com *M. sylvestris* e própolis apresentaram resultados intermediários ( $p>0,05$ ). Esse estudo demonstrou diferentes valores de pH e de atividades antibacteriana e antibiofilme dos antissépticos formulados com produtos naturais, sendo o antisséptico com *M. sylvestris* mais efetivo do que com própolis, entretanto, estes produtos ainda não apresentam efeito comparável ao antisséptico sintético, o que deve ser levado em consideração para a prescrição.

**Palavras-chaves:** antissépticos bucais; produtos naturais; biofilme.

## ABSTRACT

The formulation and use of oral antiseptics with natural products is expanding due to changes in patterns of conscious and sustainable consumption, as well as the safety of the patient and the environment. The aim of this study was to evaluate the pH and the antibacterial and antibiofilm activities of antiseptics formulated with *Malva sylvestris* (Malvatricin Plus®) or propolis (Proporalcare®). As positive and negative controls, with and without antibacterial and antibiofilm activities, chlorhexidine (PerioGard®) and 0.85% saline solution were used, respectively. Measurement of the pH of a 12 mL sample of each antiseptic was provided by means of a pH meter. In addition, the double layer agar diffusion technique was used to determine the antibacterial activity of antiseptics against the standard strains: *Streptococcus mutans* (ATCC 25175) and *Streptococcus sobrinus* (ATCC 27607). Regarding antibiofilm activity, a total of 72 specimens of bovine teeth (2x5x5mm) were used to form a biofilm with the standard strains of *S. mutans* and *S. sobrinus* at 37°C for 24h, in microaerophilia, and under orbital agitation. After this period, the samples were randomly divided into 4 groups (n = 9) according to the different treatments: G1-negative control (0.85% saline in contact with biofilms for 1min); G2-Malvatricin Plus® in contact with biofilms for 1min; G3-Proporalcare® in contact with biofilms for 1min and G4-control-positive (PerioGard® in contact with biofilms for 1min). After the treatments, the samples were transferred to microtubes containing 1mL of Lethen broth and glass beads, homogenized, diluted and aliquots sown on the surface of Petri dishes with SB20. The bacterial load present in biofilms was determined after incubation at 37°C for 48 hours of incubation in microaerophilia. The results of the microbiological analysis were compared and evaluated by the Kruskal-Wallis test followed by the Dunn post-test ( $\alpha = 0.05$ ). The antiseptics of G2 and G4 showed an acid pH of 6.60 and 5.72, respectively and of G3 alkaline pH (7.6). The antibacterial activity of antiseptics with G2 and G4 were statistically similar against *S. mutans* ( $p = 0.313$ ) and *S. sobrinus* ( $p = 0.310$ ), and different among the other groups ( $p < 0.05$ ), which did not show activity. Regarding antibiofilm activity, there was a statistically significant difference between G1 and G4 antiseptic against *S. mutans* ( $p = 0.034$ ) and *S. sobrinus* ( $p = 0.009$ ), with antiseptics formulated with *M. sylvestris* and propolis showing intermediate results ( $p > 0.05$ ). This study demonstrated different pH values and antibacterial and antibiofilm activities of the antiseptics formulated with natural products, the antiseptic with *M. sylvestris* being more effective than with propolis, however, these products still do not have an effect comparable to the synthetic antiseptic, which should be taken into account for the prescription.

**Keywords:** oral antiseptics; natural products; biofilm.

## SUMÁRIO

|   |                     |    |
|---|---------------------|----|
| 1 | INTRODUÇÃO          | 06 |
| 2 | JUSTIFICATIVA       | 10 |
| 3 | OBJETIVO            | 11 |
| 4 | MATERIAIS E MÉTODOS | 12 |
| 5 | RESULTADO           | 18 |
| 6 | DISCUSSÃO           | 21 |
| 7 | CONCLUSÃO           | 23 |
|   | REFERÊNCIAS         | 24 |

## 1. INTRODUÇÃO

Biofilmes orais são agregados de múltiplas espécies microbianas que podem aderir ao esmalte e aos tecidos moles da boca (ZIJNGE *et al.*, 2010). Eliminar e prevenir o acúmulo de biofilme é imperativo no combate às afecções bucais (SERBIAK *et al.*, 2018).

Os estudos têm mostrado que a escovação sozinha pode não ser completamente eficaz na prevenção do acúmulo de biofilme (VAN DER WEIJDEN e HIOE, 2005). Frente às limitações dos métodos mecânicos, o uso de soluções antissépticas como adjuvantes da higiene bucal e na entrega de agentes ativos aos dentes e gengivas tem sido recomendado (CHATTERJEE *et al.*, 2017; LYNCH *et al.*, 2018). Há relatos de que o benefício terapêutico da remoção mecânica do biofilme é melhorado quando em combinação com a ação antimicrobiana dos agentes presentes nos antissépticos bucais que por sua vez, não apenas fornecem efeitos antimicrobianos adicionais, mas também penetram em áreas da cavidade bucal menos acessíveis aos instrumentos mecânicos e dentifrícios (SHARMA *et al.*, 2004; BECERIK *et al.*, 2011).

Um antisséptico ideal deve possuir estabilidade, baixa tensão superficial, poder antimicrobiano e ausência de toxicidade. A clorexidina (CHX) é considerada o padrão-ouro dos antissépticos bucais, com um histórico significativo de uso na odontologia e eficácia documentada frente a uma ampla variedade de bactérias, incluindo espécies gram-positivas, gram-negativas, aeróbias e anaeróbias (ZHENG e WANG, 2011; MATHUR *et al.*, 2011). A ação está no seu potencial de se ligar à parede celular bacteriana, mostrando efeito bactericida, quando em altas concentrações e bacteriostático em baixas doses. Entretanto, apesar dos benefícios clínicos, os efeitos colaterais da CHX preocupam não apenas o paciente, mas também os profissionais uma vez que o uso prolongado pode resultar em alterações da sensação gustativa, coloração dos dentes, língua e restaurações e sensação de queimação e irritação na mucosa oral (MCCOY *et al.*, 2008; KOUADIO *et al.*, 2017).

Da mesma forma, outros antissépticos bucais podem causar a alteração da cor do elemento dental, devido à desmineralização do esmalte e consequentemente aumento da rugosidade e alteração na dureza superficial (MOREIRA *et al.*, 2013). Esses efeitos adversos aumentam as demandas para

explorar agentes alternativos para a promoção da saúde bucal.

Os produtos naturais têm sido utilizados para fins de medicina popular em todo o mundo há milhares de anos (BERNARDINI *et al.*, 2017; KHURSHID *et al.*, 2017). Uma das justificativas, é que o produto fitoterápico se difere dos medicamentos alopáticos, pois o princípio ativo da planta não é isolado, agindo em conjunto com outros componentes do vegetal, que dá-se o nome de fitocomplexo, com uma redução dos efeitos indesejáveis (BARBOSA e FARIA, 2014).

Muitos deles apresentam propriedades farmacológicas, com ação antimicrobiana, anti-inflamatória e citostática. Além disso, alguns destes produtos apresentam em sua composição substâncias com atividade anticariogênica que podem suprimir o crescimento de bactérias presentes na cavidade bucal, além de inibir a síntese de glucano a partir da sacarose pela glicosiltransferase (STEVANATO; GONÇALVES ;YAMAGUCHI, 2013).

Desta forma, a utilização de produtos naturais poderia reduzir a alta incidência de doenças que afetam o elemento dental (JUIZ;ALVES;BARROS, 2009).Dentre eles, a própolis e a *Malva sylvestris* têm sido reconhecidas como agentes benéficos para a saúde humana, podendo ser úteis para melhorar a qualidade de vida da população (BENSO *et al.* 2015; DANTAS SILVA *et al.* 2017).

A própolis, substância produzida pelas abelhas, é um potente agente antimicrobiano e anti-inflamatório. As abelhas coletam a resina da flora, e ao mastigarem, as enzimas salivares são adicionadas e o material parcialmente digerido é misturado com cera de abelha e usado para vedar buracos em seus favos de mel, suavizar as paredes internas e proteger contra a entrada de outras espécies (KHURSHID *et al.*, 2017).

Os efeitos terapêuticos da própolis têm sido objeto de pesquisas ao longo dos anos, e diretrizes recentes sugerem seu potencial para uso no futuro. Uma das aplicações mais estudadas da própolis em todo o mundo tem sido na odontologia, onde os relatórios científicos datam de 1952 (WIĘCKIEWICZ *et al.*, 2013; KHURSHID *et al.*, 2017).

Um estudo demonstrou que o mecanismo de ação da própolis seria uma bacteriólise parcial devido a ruptura da parede celular e desorganização da membrana plasmática bacteriana, bem como inibição de síntese proteica. Tendo uma propriedade antimicrobiana significativa frente à periodontopatógenos,

sugerindo que esta substância poderia ser usada para o controle do crescimento da microbiota oral. Segundo Gebara *et al.* (2002), a própolis também mostrou atividade antimicrobiana contra cepas de *A. actinomycetemcomitans*, *Prevotella intermedia*, *P. melaninogenica*, *P. gingivalis*, *Capnocytophaga gingivalis* e *Fusobacterium nucleatum*, micro-organismos envolvidos no desenvolvimento da periodontite (JUIZ; ALVES; BARROS, 2009).

Os mecanismos da atividade antimicrobiana da própolis ainda são controversos. Alguns componentes presentes nos extratos de própolis como flavonóides (quercetina, galangina, pinocembrina) e ácido cafeico, ácido benzóico, ácido cinâmico, provavelmente atuam na membrana microbiana ou no local da parede celular, causando danos funcionais e estruturais (BURDOCK, 1998; KAMBUROGLU e OZEN. 2011). Entretanto, a composição química da própolis parece variar segundo a época e região onde é coletada, com alteração quantitativa e qualitativa dos seus princípios ativo, mas segundo Sforcin *et al.*, (2000), a própolis coletada no Brasil não mostra variação (JUIZ; ALVES; BARROS, 2009).

O uso do chá de malva sempre foi considerado benéfico para a saúde na opinião popular contra inflamações e infecções. A *Malva sylvestris*, da família Malvaceae, é benéfica em amplos aspectos para a saúde, e exerce supostamente atividades anti-inflamatória, antioxidante, bacteriostática, antinociceptiva e anticolinesterásica. Investigações revelaram que *Malva sylvestris* contém vários componentes químicos biologicamente ativos que incluem óleos essenciais, sesquiterpenos, leucoantocianidinas, antocianinas e cumarinas (PRUDENTE *et al.* 2017; BRAGA *et al.* 2018). Considerando o exposto, a associação entre estes produtos medicinais e materiais odontológicos, incluindo os antissépticos bucais tem sido proposta (DODWAD e KUKREJA. 2011)

Um estudo realizado para avaliar a atividade antimicrobiana do enxaguante *Malvatricin* e seus componentes em relação ao *Streptococcus mutans* e *Lactobacillus spp* e em pool de micro-organismos da cavidade oral, comprovou que o produto comercial teve efetiva atividade antimicrobiana devido principalmente ao quinosol, presente em sua composição (MOREIRA, 2011).

Entretanto, ainda são escassos os estudos que avaliam as propriedades dos antissépticos à base de própolis e *Malva sylvestris*, disponíveis no mercado.

Diante disso, este trabalho tem como objetivo avaliar *in vitro* o pH e a eficácia antimicrobiana de um antisséptico fitoterápico e um à base de própolis, disponíveis no mercado, em comparação com um antisséptico químico conhecido, à base de clorexidina.

## 2.JUSTIFICATIVA

Apesar dos avanços na área odontológica, a doença cárie ainda continua sendo um grande problema de saúde pública. Este projeto justifica-se com o intuito da promoção da saúde uma vez que a falta de controle do biofilme expõe o indivíduo a uma situação de risco da doença cárie dentária de forma que pode haver o surgimento de manchas brancas ativas na superfície do esmalte dentário, as quais consistem no primeiro sinal clínico da doença, podendo evoluir para situações mais complexas e até levar a perda do elemento dental (STEVANATO; GONÇALVES; YAMAGUCHI, 2013).

Portanto, esse estudo pode trazer resultados significativos sobre a ação antibiofilme e antimicrobiana da própolis e *Malva sylvestris*, em relação a *Streptococcus mutans* e *Streptococcus sobrinus*, colaborando na promoção de saúde do paciente.

### **3. OBJETIVOS**

Avaliar o pH e as propriedades antimicrobiana de antissépticos bucais à base de produtos naturais em comparação com um antisséptico químico conhecido, à base de clorexidina.

## 4. MATERIAIS E MÉTODOS

### Materiais

No presente estudo foram utilizados os antissépticos à base da *Malva sylvestris* (Malvatricin Plus<sup>®</sup>), da própolis (Proporalcare<sup>®</sup>) e clorexidina (PerioGard<sup>®</sup>) (Figura 1).

**Figura 1.** Antissépticos utilizados no estudo



A composição de cada produto é detalhada na Tabela 1.

**Tabela 1.** Composição dos Antissépticos

| Periogard                  | Malvatricin Plus                              | PropOralcare                      |
|----------------------------|-----------------------------------------------|-----------------------------------|
| Aqua                       | EDTA dissódico                                | Aqua                              |
| Glicerina                  | Extrato de folha de Malva Sylvestris          | Complexo de Clorofina             |
| Propilenoglicol            | L-Mentol                                      | Glicerina                         |
| Sorbitol                   | Óleo de rícino hidrogenado                    | Extrato de flor Lonicera Japonica |
| Óleo de rícino hidrogenado | PEG 40                                        |                                   |
| PEG 40                     | Propilenoglicol                               |                                   |
| Digluconato de clorexidina | Copolímero de PVM / MA                        | Mentol                            |
| Aroma                      | Benzoato de Sódio                             | Extrato de Própolis               |
| Cloreto de cetilpiridínio  | Fluoreto de Sódio (corresp.a 225ppm de Flúor) | Sucralose                         |
| Ácido Cítrico              | Hidróxido de Sódio                            |                                   |
| CL 42090                   | Lauril Sulfato De Sódio                       |                                   |
|                            | Sacarina Sódica                               |                                   |
|                            | Sorbitol                                      |                                   |
|                            | Triclosan                                     |                                   |
|                            | Xilitol                                       |                                   |
|                            | Cloreto De Zinco                              |                                   |
|                            | Aroma                                         |                                   |
|                            | CL 15985                                      |                                   |
|                            | CL 47005                                      |                                   |
|                            | Aqua                                          |                                   |
|                            | Fluoreto de Sódio                             |                                   |

## Métodos

### **Análise do pH**

O pH dos antissépticos bucais foi aferido no ato da abertura dos frascos utilizando um pHmetro digital previamente calibrado introduzindo, respectivamente, um tampão neutro (7) e tampão ácido (4). Assim, após depurar com água destilada para retirar os resíduos indesejáveis, foram inseridos aproximadamente 12 mL das soluções, as quais recobriram todo eletrodo (Figura 2).

**Figura 2.** Análise do pH com uso do pHmetro digital



### **Análise da Atividade Antimicrobiana dos Antissépticos Buciais pelo Método de Difusão em Ágar**

Para a análise da efetividade antimicrobiana foi empregado o teste de disco-difusão em ágar.

Os micro-organismos foram obtidos a partir de culturas frescas e transferidos para tubos de ensaio com solução de PBS. A padronização do inóculo foi realizada medindo a densidade óptica usando um espectrofotômetro, com leitura de absorbância de 0,08 a 0,10 a 625 nm de comprimento de onda ( $10^8$  UFC / mL).

O meio de cultura BHI (Brain Heart Infusion) foi preparado, esterilizado de acordo com as instruções do fabricante e distribuído em placas de Petri estéreis de 90mm<sup>2</sup> para obtenção da camada base de 12 mL. Tubos de ensaio contendo 20 mL de meio de cultura esterilizado foram mantidos em banho-maria a 45°C. Nestes tubos foram inseridos 200 µL dos diferentes inóculos microbianos padronizados. As soluções obtidas foram

homogeneizadas e 8 mL foram transferidos para a placa de Petri e depositados sobre a camada base solidificada, formando a camada *seed*.

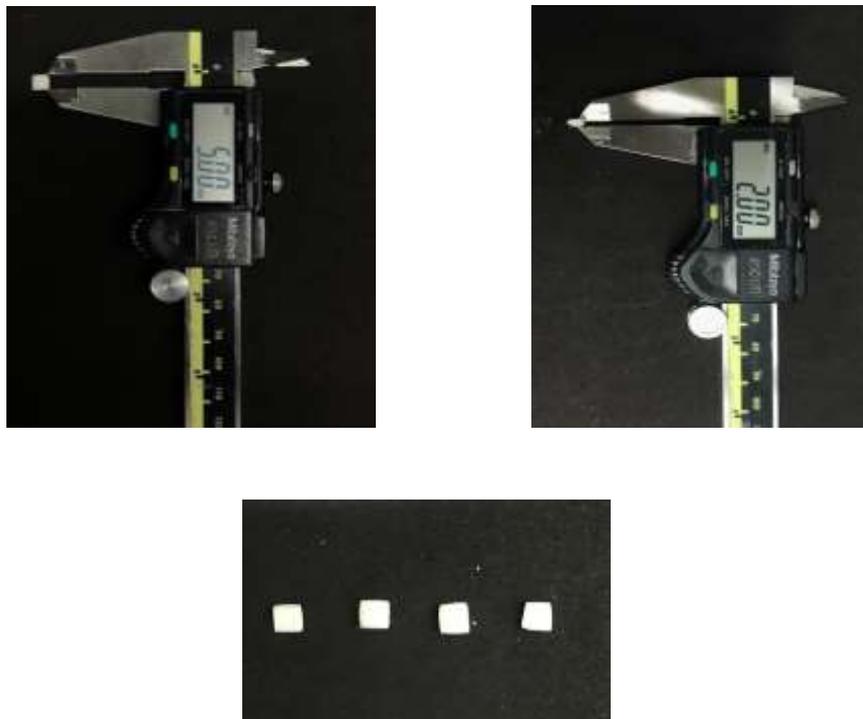
Após a solidificação desta camada, foram confeccionados poços com 3 mm de diâmetro nas placas de Petri, com auxílio de canudos plásticos. Em seguida, em cada poço foram adicionados 20  $\mu$ L dos antissépticos e as placas de Petri foram pré-incubadas a temperatura ambiente por 2 horas, para permitir a difusão do produto no meio de cultura. Decorrido o período, as placas de Petri foram incubadas a 37°C durante 24 horas em uma estufa microbiológica. Após este período, as zonas de inibição formadas foram medidas.

### ***Obtenção dos Espécimes***

Para a realização deste estudo levou-se em consideração os princípios éticos contidos na Declaração de Helsink (2000). 72 espécimes (5 x 5 x 2 mm de espessura) foram obtidos a partir de incisivos centrais bovinos hígidos. Para isso, inicialmente as raízes dentárias foram removidas 2 mm abaixo da junção amelo-cementária, utilizando-se um disco diamantado. Foi realizada a limpeza dos dentes com curetas periodontais e pasta de pedra pomes com água e estes foram mantidos em solução de formol a temperatura de 4°C durante 7 dias. As regiões dos dentes foram demarcadas e após o corte, a fim de padronizar o tamanho, os espécimes foram lixados em uma politriz, utilizando lixas de carbetto de silício na sequência de granulação 320 e 600. O tamanho foi checado por meio do uso de um paquímetro digital.

**Figura 3.** Obtenção dos espécimes





### ***Padronização da Rugosidade Superficial***

A rugosidade superficial influencia na adesão dos micro-organismos. Assim, para os ensaios microbiológicos envolvendo a formação do biofilme, os espécimes foram lixados e foi padronizada a rugosidade através do Rugosímetro (Surftest SJ-201P, Mitutoyo Corporation, Japan).

### ***Esterilização dos Espécimes***

Os espécimes utilizados para os ensaios microbiológicos foram acondicionados em envelopes especiais e esterilizados com peróxido de hidrogênio.

**Figura 4.** Espécimes esterilizados



### **Formação do Biofilme**

O experimento bacteriológico foi conduzido de acordo com os princípios básicos da assepsia em Cabines de Segurança Biológica de Classe II (Grupo VECO, Campinas, SP, Brasil). *Streptococcus mutans* (ATCC 25175) e *Streptococcus sobrinus* (ATCC 27607) foram cultivados em placa de Petri (15x60mm) com SB20-modificado e incubados em estufa bacteriológica (Quimis, Diadema, SP, Brasil) a 37°C por 24h, a fim de obter culturas em crescimento exponencial. As colônias microbianas foram diluídas em solução salina tamponada com fosfato (PBS) e para alcançar um inóculo contendo  $\sim 10^8$  UFC/mL, uma leitura da densidade óptica foi realizada com um espectrofotômetro (Spectrumlab, China) a 625 nm de comprimento de onda. Os espécimes foram distribuídos individualmente em placas de cultura de 24 poços (TPP, Trasadingen, Suíça), manipuladas com pinças estéreis. Cada espécime recebeu 2mL do meio de cultura inoculado. As placas foram incubadas em um agitador orbital (Quimis, Diadema, SP, Brasil) a 37°C e 80rpm por 24 horas.

### **Tratamento dos espécimes**

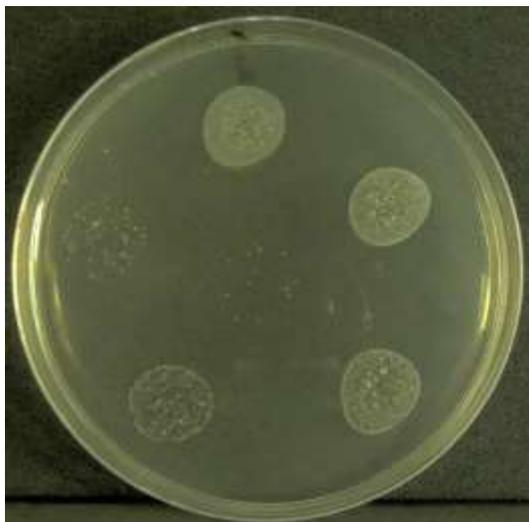
Após o período de incubação, os espécimes foram lavados com solução salina a 0,85% três vezes, a fim de remover as células planctônicas. Posteriormente, foram divididos aleatoriamente em quatro grupos (n=9), de acordo com o tratamento recebido, conforme segue: G1 – Controle (tratamento por 1 minuto com Solução Salina); G2- tratamento por 1 minuto com antisséptico Malvatricin Plus<sup>®</sup> (Laboratório Daudt Oliveira Ltda; Rio de Janeiro; RJ; Brasil); G3 - tratamento por 1 minuto com antisséptico Proporalcare<sup>®</sup> (Lemos e Rago LTDA; Nova Lima; MG; Brasil) e G4 - tratamento por 1 minuto com antisséptico PerioGard<sup>®</sup> (Colgate-Palmolive industrial LTDA; S.B Campo; SP; Brasil.).

### **Contagem das Unidades Formadoras de Colônias**

Após os tratamentos, as amostras foram transferidas para microtubos

contendo 1mL de Caldo Letheen e esferas de vidro (~ 0,3 mm). Os tubos foram homogeneizados em agitador tubular (Phoenix Lufarco, Araraquara, SP, Brasil) por 2 minutos e alíquotas de 50µL foram diluídas ( $10^{-1}$  a  $10^{-5}$ ) e semeadas em placas de Petri com ágar SB20-modificado. As Placas de Petri foram incubadas a 37°C por 24h, quando então a contagem das colônias foi realizada com estereomicroscópio trinocular. Os valores de UFC/mL foram convertidos em  $\log_{10}$ .

**Figura 5.** Diluições seriadas em placa de Petri



### **Análise estatística**

Os resultados da análise microbiológica foram comparados e avaliados pelo teste de Kruskal-Wallis seguido pelo pós-teste de Dunn ( $\alpha=0,05$ ).

## 5. RESULTADOS

### **Análise do pH**

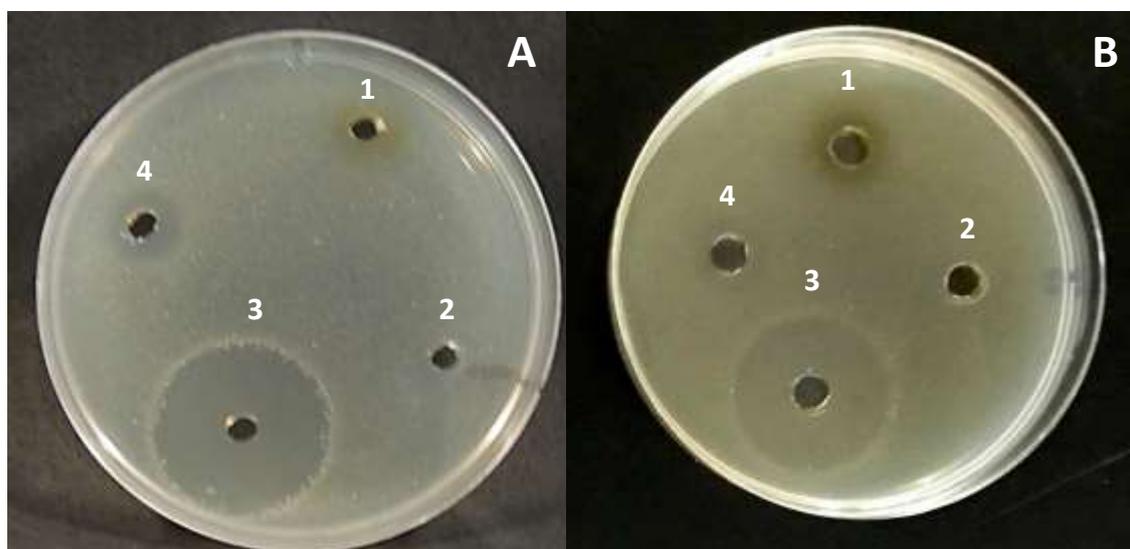
Os valores do pH dos antissépticos bucais são apresentados na Tabela 2. O Malvatricin Plus<sup>®</sup> e o PerioGard<sup>®</sup> apresentaram pH ácido e o antisséptico à base de própolis pH de básico.

| Tabela 2.pH dos antissépticos |      |
|-------------------------------|------|
| ANTISSEPTICOS                 | pH   |
| Malvatricin Plus              | 6,60 |
| Proporalcare                  | 7,6  |
| PerioGard                     | 5,72 |

### **Halo de Inibição**

A Figura 6 mostra os resultados da zona de inibição. Não foi observada atividade inibitória para o grupo controle e para o antisséptico a base de própolis.

**Figura 6.** Zona de Inibição formada. A- *S. mutans*; B – *S. sobrinus*.1- Antisséptico à base de própolis; 2- Controle (Solução Salina); 3- Antissépticos à base de clorexidina e – Antisséptico à base da Malva sylvestris



A Tabela 3 mostra as zonas médias de diâmetro de inibição (em mm), assim como o desvio padrão e as diferenças entre os grupos.

O efeito antimicrobiano dos antissépticos bucais à base da *Malva sylvestris* e da Clorexidina foi observado através do método do halo de inibição, sendo ambos os grupos estatisticamente semelhantes entre si frente ao *S. sobrinus* ( $p=0,310$ ) e ao *S. mutans* ( $p=0,313$ ), e diferentes dos demais grupos ( $p<0,05$ ).

**Tabela 3.** Mediana e Intervalo de Confiança [IC] dos halos formados.

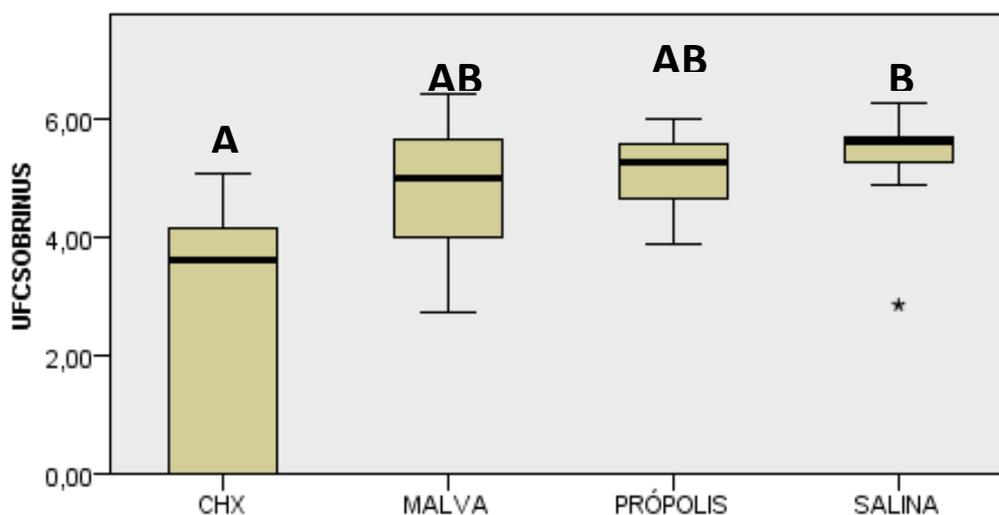
| Micro-organismo    | Controle       | Proporalcare   | Malvatricin                         | Clorexidina                         |
|--------------------|----------------|----------------|-------------------------------------|-------------------------------------|
| <i>S. mutans</i>   | 0 <sup>A</sup> | 0 <sup>A</sup> | 11,00[10,51;11,71] <sup>B</sup>     | 28,00<br>[28,00;29,33] <sup>B</sup> |
| <i>S. sobrinus</i> | 0 <sup>A</sup> | 0 <sup>A</sup> | 13,00<br>[13,04;13,85] <sup>B</sup> | 28,00<br>[27,15;27,96] <sup>B</sup> |

Letras diferentes indicam diferenças significativas entre os grupos para o mesmo micro-organismo

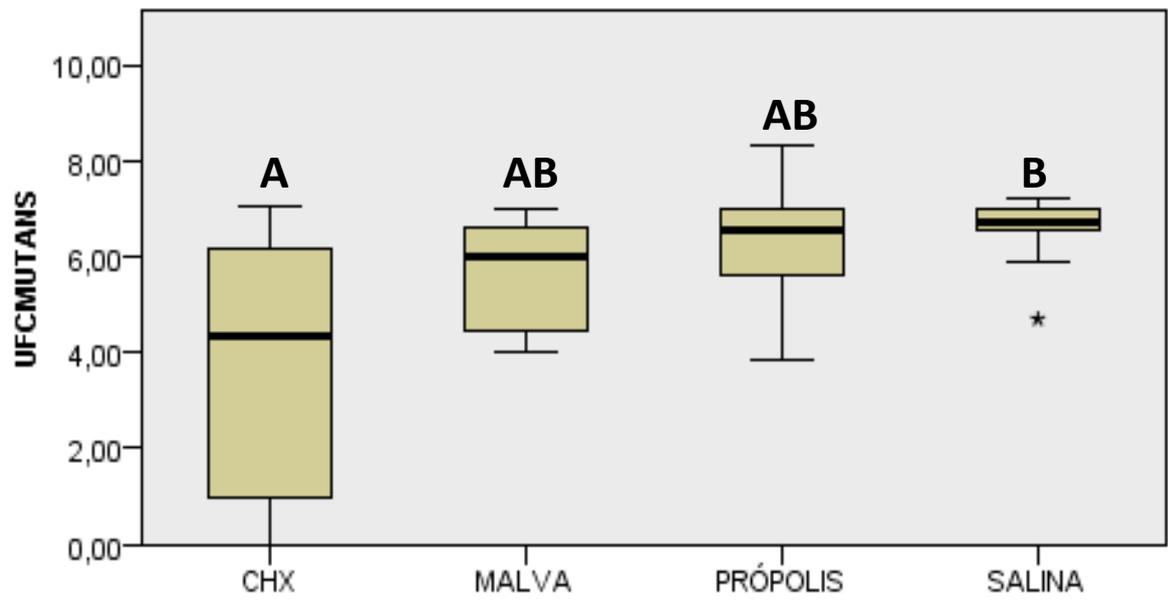
### Unidades Formadoras de Colônias

Ao avaliar a atividade antibiofilme por meio da contagem de UFC nota-se diferença estatisticamente significativa entre o antisséptico à base de Clorexidina e o grupo controle (Solução Salina), para *S. sobrinus* ( $p=0,009$ ) e *S. mutans* ( $p=0,034$ ). Os antissépticos à base da *Malva sylvestris* e da própolis apresentaram resultados intermediários ( $p>0,05$ ), conforme ilustram as Figuras 7 e 8.

**Figura 7.** Contagem de Unidades Formadoras de Colônias frente a *S. sobrinus*



**Figura 8.** Contagem de Unidades Formadoras de Colônias frente a *S. mutans*



## 6. DISCUSSÃO

O uso a curto prazo de enxaguatórios bucais antimicrobianos tem sido considerado uma terapia adicional para o controle da cárie dentária em pacientes com falta de higiene ou com condições que comprometem sua saúde bucal (VOZZA *et al.* 2015). Há relatos, entretanto, da existência de efeitos colaterais, quando do uso da clorexidina (CHX), por exemplo, por mais de quatro semanas (JAMES *et al.* 2017). Devido a essa limitação, produtos naturais têm sido introduzidos no comércio odontológico como uma alternativa aos agentes convencionais (FREIRES e ROSALEN,2016).

Para comparar os efeitos antibacteriano e antibiofilme de enxaguatórios bucais contendo *Malva sylvestris* Própolis com a CHX, foi utilizada a técnica de difusão em ágar e realizada a contagem de unidades formadoras de colônias, respectivamente, do *S. mutans* e *S. sobrinus*.

Com relação à técnica de difusão em ágar, verificou-se que o enxaguatório bucal à base da Malva (embora menos potente que o CHX) foi eficaz na inibição das bactérias avaliadas. Por outro lado, embora estudos tenham demonstrado que alguns componentes presentes nos extratos de própolis, como os flavonóides, provavelmente atuam na membrana microbiana ou na parede celular, causando danos funcionais e estruturais (MIRZOEVA, GRISHANIN e CALDER, 1997; ÖZAN *et al.* 2007), no presente estudo o enxaguatório utilizado não foi capaz de inibir os micro-organismos.

Sabe-se também que o pH dos enxaguatórios bucais exerce influência sobre o metabolismo dos micro-organismos, sendo usualmente os colutórios com pH ácido mais efetivos no que diz respeito à redução da fermentação e produção de polissacarídeos extracelulares (SUN *et al.*, 2005), o que pode ter influenciado nos resultados visto que os antissépticos a base de Malva e CHX apresentaram pH ácido de 6,60 e 5,72, respectivamente. Entretanto, o antisséptico a base de própolis demonstrou pH alcalino.

No presente estudo, ambos os enxaguatórios a base de produtos naturais demonstraram pequena redução de log de UFC/mL em relação ao grupo controle positivo (salina), com resultados intermediários, ou seja, com semelhança estatística com este, e com o grupo da CHX, com indício de potencial como agentes antibiofilme, embora a CHX tenha sido considerada

mais promissora. A literatura tem demonstrado que o efeito da CHX em comparação com outros agentes antimicrobianos é mais pronunciado *in vitro* do que *in vivo* (HAERIAN-ARDAKANI *et al.* 2015) e, conforme relatado pode causar vários efeitos colaterais locais, incluindo coloração extrínseca do dente e a colocação marrom da língua, distúrbios do paladar e, menos comumente, descamação da mucosa oral. Esses efeitos colaterais limitam sua aceitabilidade aos usuários e o uso a longo prazo.

O Malvatricin Plus<sup>®</sup> contém agente natural (*Malva sylvestris*) combinado com fluoreto, xilitol e outros componentes. *M. sylvestris* é nativa da Europa, Norte da África e Sudoeste Asiático, particularmente do Irã (ELSAGH *et al.* 2015). É aplicado mundialmente como um agente antisséptico, antifúngico e anti-inflamatório alternativo. *M. sylvestris* também tem um efeito antimicrobiano contra *S. aureus*, *S. agalactiae*, *E. faecalis* e *C. albicans* (RAZAVI *et al.* 2011). BRAGA *et al.* (2018) também demonstrou em seu estudo que o efeito antimicrobiano deste enxaguatório foi menos evidente do que o dos outros avaliados, dentre eles o Periogard, a base de CHX, entretanto a ação anti-cárie foi comparável e atribui isto a presença de fluoreto e xilitol uma vez que sabe-se que estes são capazes de reduzir a desmineralização (BUZALAF *et al.* 2011) e favorecer a remineralização do esmalte, respectivamente (CARDOSO *et al.* 2014).

Mais estudos serão realizados para melhor entender o efeito dos enxaguatórios a base de produtos naturais. Em conclusão, existem diferenças significativas em relação ao desempenho antimicrobiano e antibiofilme dos enxaguatórios bucais testados.

## **7. CONCLUSÃO**

Esse estudo demonstrou diferentes valores de pH e de atividades antibacteriana e antibiofilme dos antissépticos bucais formulados com produtos naturais.

## REFERÊNCIAS<sup>1</sup>

BARBOSA MB, FARIA MGI. Produtos naturais como nova alternativa terapêutica para o tratamento de candidíase bucal. **Revista Uningá**; v 20, n.1, p 103-107, 2014.

BECERIK S, TÜRKÖĞLU O, EMINGIL G, VURAL C, OZDEMIR G, ATILLA G. Antimicrobial effect of adjunctive use of chlorhexidine mouthrinse in untreated gingivitis: a randomized, placebo-controlled study. **APMIS : acta pathologica, microbiologica, et immunologica Scandinavica**; v.119, n.6, p.364-372, 2011.

BENSO B, ROSALEN PL, ALENCAR SM, MURATA RM. Malva sylvestris Inhibits Inflammatory Response in Oral Human Cells. An In Vitro Infection Model. **PLoS One**, v.10, n.10, p.e0140331, 2015.

BERNARDINI S, TIEZZI A, LAGHEZZA MASCI V, OVIDI E. Natural products for human health: an historical overview of the drug discovery approaches. **Natural Product Research**. 2017.

BRAGA AS, PIRES JG, MAGALHÃES AC. Effect of a mouthrinse containing Malva sylvestris on the viability and activity of microcosm biofilm and on enamel demineralization compared to known antimicrobials mouthrinses. **Biofouling**, v.34, n.3, p.252–261, 2018.

BURDOCK GA. Review of the biological properties and toxicity of bee propolis (propolis). Food and chemical toxicology: an international journal published for the British Industrial. **Biological Research Association**, v.36, n.4, p.347-363, 1998.

BUZALAF MA, PESSAN JP, HONORIO HM, TEN CATE JM. Mechanisms of action of fluoride for caries control. **Monogr Oral Sci**. v. 22, n.97–114, 2011.

CARDOSO CA, DE CASTILHO AR, SALOMAO PM, COSTA EN, MAGALHÃES AC, BUZALAF MA. Effect of xylitol varnishes on remineralization of artificial enamel caries lesions in vitro. **J Dent**. v.42, n.1495–1501, 2014.

CHATTERJEE A, DEBNATH K, RAO NKH. A comparative evaluation of the efficacy of curcumin and chlorhexidine mouthrinses on clinical inflammatory parameters of gingivitis: A double-blinded randomized controlled clinical study. **Journal of Indian Society of Periodontology**; v.21, n.2, p.132-137, 2017.

DANTAS SILVA RP, MACHADO BA, BARRETO GA, COSTA SS, ANDRADE LN, AMARAL RG, et al. Antioxidant, antimicrobial, antiparasitic, and cytotoxic properties of various Brazilian propolis extracts. **PLoS One**, v.12, n.3, p.e0172585, 2017.

DODWAD V, KUKREJA BJ. Propolis mouthwash: A new beginning. **Journal of**

<sup>1</sup>De acordo com a Associação Brasileira de Normas Técnicas. NBR 6023: Informação e documentação: referências: elaboração. Rio de Janeiro, 2002.

**Indian Society of Periodontology**; v.15, n.2, p.121-125, 2011.

ELSAGH M, FARTOOKZADEH MR, KAMALINEJAD M, ANUSHIRAVANIM, FEIZI A, BEHBAHANI FA, RAFIEI R, ARJMANDPOUR A, ADIBI P. Efficacy of the *Malva sylvestris* L. flowers a que o use xtract for functional constipation: A placebo controlled trial. **Complement Ther Clin Pract.** v.21, p.105–111, 2015.

FREIRES IA, ROSALEN PL. How natural product research has contributed to oral care product development? A critical view. **Pharm Res.** v. 2016, p.1– 6, 2016

HAERIAN-ARDAKANI A, REZAEI M, TALEBI-ARDAKANI M, KESHAVARZVALLIAN N, AMID R, MEIMANDI M, ESMAILNEJAD A, ARIANKIA A. Comparison o fantimicrobia leffects of three different mouthwashes. **Iran J Public Health**; v.44, n.997–1003, 2015.

JUIZ PJI, ALVES RJC, BARROS TF. Uso de produtos naturais como coadjuvante no tratamento da doença periodontal. **Revista Brasileira de Farmacognosia**; v.20, n.1, p.134-139, 2010.

KAMBUROGLU K, OZEN T. Analgesic effect of Anatolian propolis in mice. **The journal of the Turkish Society of Algology**, v.23, n.2, p.47– 50, 2011.

KHURSHID Z, NASEEM M, ZAFAR MS, NAJEEB S, ZOHAIB S. Propolis: A natural biomaterial for dental and oral healthcare. **Journal of Dental Research, Dental Clinics, Dental Prospects**, v.11, n.4, p.265-274, 2017.

KOUADIO AA, STRUILLLOU X, BORIES C, BOULER JM, BADRAN Z, SOUEIDAN A. An in vitro analysis model for investigating the staining effect of various chlorhexidine-based mouthwashes. **Journal of Clinical and Experimental Dentistry**; v.9, n.3; p.e410-e416, 2017.

LYNCH MC, CORTELLI SC, MCGUIRE JA, ZHANG J, RICCI-NITTEL D, MORDAS CJ, et al. The effects of essential oil mouthrinses with or without alcohol on plaque and gingivitis: a randomized controlled clinical study. **BMC Oral Health**; v.18, n.1, p.6, 2018.

MATHUR S, TANU M, RAHUL S. Chlorhexidine: The gold standard in Chemical Plaque Control. **National Journal of Physiology, Pharmacy & Pharmacology**; v.1; n.2, p.45-50, 2011.

MCCOY LC, WEHLER CJ, RICH SE, GARCIA RI, MILLER DR, JONES JA. Adverse events associated with chlorhexidine use: results from the Department of Veterans Affairs Dental Diabetes Study. **The Journal of the American Dental Association**; v.139, n.2, p.178-183, 2008.

MIRZOEVA OK, GRISHANIN RN, CALDER PC. Antimicrobial action of propolis and some of its components: the effects on growth, membrane potential and motility of bacteria. **Microbiol Res.** v.152, p.239–246, 1997.

MOREIRA AD, MATTOS CT, DE ARAÚJO MV, RUELLAS AC, SANT'ANNA EF. Chromatic analysis of teeth exposed to different mouthrinses. **Journal of Dentistry**; v.41 Suppl 5, p.e24-27, 2013.

MOREIRA MJS, HASHZUME LN FERREIRA MBC. Avaliação in vitro da atividade antimicrobiana de um enxaguatório bucal contendo Malva e seus componentes. **Pesquisa Brasileira em Odontopediatria e Clínica Integrada**; v 12, n 4, p 505-509, 2012.

ÖZAN F, ZEYNEP S, ZÜBEYDE AP, KÜRSAT E, ÜLKÜ O, Orhan D. Effect of Mouthrinse Containing Propolis on Oral Microorganisms and Human Gingival Fibroblasts. **Eur J Dent**; v.1, n.4, p.195–201, 2007.

PRUDENTE AS, SPONCHIADO G, MENDES DAGB, SOLEY BS, CABRINI DA, OTUKI MF. Pre-clinical efficacy assessment of Malva sylvestris on chronic skin inflammation. **Biomedicine & pharmacotherapy**, v.93, p.852-860, 2017.

RAZAVI SM, ZARRINI G, MOLAVI G, GHASEMI G. Bioactivity of Malva sylvestris L., a medicinal plant from Iran. **Iran J Basic MedSci**; v.14, n.574–579, 2011.

SERBIAK B, FOURRE T, GEONNOTTI AR, GAMBONI RJ. In vitro efficacy of essential oil mouthrinse versus dentifrices. **Journal of Dentistry**; v.69, p.49-54, 2018.

SHARMA N, CHARLES CH, LYNCH MC, QAQISH J, MCGUIRE JA, GALUSTIANS JG, et al., Adjunctive benefit of an essential oil-containing mouthrinse in reducing plaque and gingivitis in patients who brush and floss regularly: a six-month study. **The Journal of the American Dental Association**; v.135, n.4, p.496-504, 2004.

STEVANATO JO, GONÇALVES JE, YAMAGUCHI MU. **Análise química e microbiológica de extratos de própolis para possível aplicação em formulações de enxaguantes bucais para ação anti-cárie**. Dissertação (Mestrado em Promoção da Saúde) –Centro Universitário Cesumar. Maringá, p.78, 2013.

SUM FC, ENGELMAN EE, MCGUIRE JA, KOSMOSKI G, CARATELLO L, RICCINITTEL D, ZHANG JZ, SCHEMEHORN BR, GAMBONI RJ. Impact of an Anticaries Mouthrinse on In Vitro Remineralization and Microbial Control. **International Journal of Dentistry**; v. 2014, n.982071, 2014.

VAN DER WEIJDEN GA, HIOE KP. A systematic review of the effectiveness of self-performed mechanical plaque removal in adults with gingivitis using a manual toothbrush. **Journal of Clinical Periodontology**; 32 Suppl 6, p.214-228, 2005.

VOZZA I, CAVALLE E, CORRIDORE D, RIPARI F, SPOTA A, BRUGNOLETTI O, GUERRA F. Preventive strategies in oral health for special needs patients. **Ann Stomatol (Roma)**. v.6, p.96–99, 2015.

ZHENG CY, WANG ZH. Effects of chlorhexidine, listerine and fluoride listerine mouthrinses on four putative root-caries pathogens in the biofilm. **The Chinese journal of dental research : the official journal of the Scientific Section of the Chinese Stomatological Association**; v.14, n.2, p.135-140,2011.

ZIJNGE V, VAN LEEUWEN MB, DEGENER JE, ABBAS F, THURNHEER T, GMÜR R, et al. Oral biofilm architecture on natural teeth. **PLoS One**; v.5, n.2, p.e9321, 2010.