UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE RIBEIRÃO PRETO

Ana Paula Terossi de Godoi

**Estudo do Óleo essencial de *Casearia sylvestris* e da Formulação de
Enxaguatório bucal. Caracterização química, Citotoxicidade, Potencial
antimicrobiano e Efeito nas propriedades dos Materiais Odontológicos
estéticos**

Ribeirão Preto

- 2013-

Ana Paula Terossi de Godoi

Estudo do Óleo essencial de *Casearia sylvestris* e da Formulação de Enxaguatório bucal. Caracterização química, Citotoxicidade, Potencial antimicrobiano e Efeito nas propriedades dos Materiais Odontológicos estéticos

Tese apresentada à Faculdade de Odontologia de
Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo para
obtenção do título de Doutor no Programa de
Reabilitação Oral.

Área de Concentração: Reabilitação Oral

Orientador: Profª. Dra. Alma Blásida Concepción
Elizaur Benitez Catirse

Co-orientadora: Profª. Dra. Nieve Araçari
Jacometti Cardoso Furtado

VERSÃO ORIGINAL

Ribeirão Preto

- 2013-

**AUTORIZO A REPRODUÇÃO E DIVULGAÇÃO DO TEOR TOTAL OU PARCIAL DESTES
TRABALHO POR QUALQUER MEIO CONVENCIONAL OU ELETRÔNICO, PARA FINS DE
ESTUDO E PESQUISA, DESDE QUE CITADA A FONTE.**

FICHA CATALOGRÁFICA

Godoi, Ana Paula Terossi de

Estudo do Óleo essencial de *Casearia sylvestris* e da Formulação de Enxaguatório bucal. Caracterização química, Citotoxicidade, Potencial antimicrobiano e Efeito nas propriedades dos Materiais Odontológicos estéticos. Ribeirão Preto, 2013.

210p. : il.; 30 cm

Tese de Doutorado, apresentada à Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto/USP. Área de Concentração: Reabilitação Oral.

Orientador: Catirse, Alma Blásida Concepción Elizaur Benitez

Co-orientadora: Furtado, Nieve Araçari Jacometti Cardoso

1. *Casearia sylvestris*. 2. Atividade antimicrobiana. 3. Citotoxicidade.
4. Materiais restauradores. 5. Enxaguatório Bucal.

FOLHA DE APROVAÇÃO

Ana Paula Terossi de Godoi

Estudo do Óleo essencial de *Casearia sylvestris* e da Formulação de Enxaguatório bucal. Caracterização química, Citotoxicidade, Potencial antimicrobiano e Efeito nas propriedades dos Materiais Odontológicos estéticos.

Tese apresentada à Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Doutor no Programa de Reabilitação Oral.

Área de Concentração: Reabilitação Oral

Aprovado em: ____/____/____

Banca Examinadora

Prof(a). Dr(a).: _____ Instituição: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

Prof(a). Dr(a).: _____ Instituição: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

Prof(a). Dr(a).: _____ Instituição: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

Prof(a). Dr(a).: _____ Instituição: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

Prof(a). Dr(a).: _____ Instituição: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

"Construí amigos, enfrentei derrotas, venci obstáculos, bati na porta da vida e disse-lhe: Não tenho medo de vivê-la "

Augusto Cury

Dedicatória

Á Deus,

por guiar meus passos, dando-me sabedoria em todas as decisões da minha vida. Sem Ele, certamente eu não conseguiria finalizar esse trabalho.

Aos meus amados pais, **Osmar Luis de Godoi** e **Angela Maria Terossi de Godoi**, dedico mais essa conquista, pois ela nada mais é do que o resultado do esforço de vocês. Vocês me ensinaram todos os valores da vida: responsabilidade, honestidade, perseverança, simplicidade, respeito e acima de tudo sempre me deram muito amor, tornando possível meu sonho de ser cirurgiã-dentista, de ser mestre e agora doutora pela Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto. Sei o quanto se sacrificaram abdicando dos seus próprios sonhos para tornar realidade os meus; só nós sabemos o quanto foi difícil chegar neste momento, mas só eu sei o quanto sempre me ampararam, me guiaram e mesmo quando não tinham certeza se daria certo, me apoiaram, acreditando em mim, fortalecendo-me nos meus momentos de fraqueza e me incentivando quando tudo parecia perdido. Mesmo que esta tese inteira fosse escrita sobre vocês e para vocês eu não teria palavras para demonstrar o quanto sou grata pela oportunidade que me dão e por sempre estarem junto a mim me guiando e amparando nos momentos felizes e tristes de minha vida. Assim, fica aqui, mais uma vez, registrado o meu, muito obrigada, primeiramente por tudo que vocês fizeram e fazem por mim e, em segundo lugar por ter participado ativamente deste trabalho. Se pegarem minha dissertação de mestrado notarão que a dedicatória é muito parecida, isso porque a minha vida inteira foi, é e será de gratidão e amor à vocês, pois minha vida e minhas conquistas não teria nenhum sentido se vocês não existissem comigo.

As minhas irmãs e amigas, **Francislene Maria Terossi de Godoi Carvalho** e **Fernanda Cristina Terossi de Godoi** e, ao meu cunhado, **Gemilson Donizeti Carvalho**, por existirem na minha vida e fazerem dela uma alegria constante, é muito bom ver e sentir que a medida que os anos passam, nossas amizades fortalecem proporcionalmente ao carinho que temos uns pelos outros. Vocês me ajudaram muito no processo desta tese, e também por isso, agradeço-vos. Amo vocês!

Ao mais novo membro da família, meu sobrinho, **Luiz Otávio Godoi Carvalho**, que entrou nas nossas vidas para iluminar e trazer muitas alegrias. Amo você!

Agradecimentos Especiais

À professora, doutora, orientadora e amiga, **Alma Blásida Concepción Elizaur Benítez Catirse** por toda orientação, confiança e carinho que sempre dedicou à mim. São aproximadamente 8 anos que estamos juntas nesta caminhada que não se limita apenas a pesquisa e ao ensino, e sim, a uma grande amizade que se formou e se estendeu a toda nossa família. A senhora, sempre me ofereceu muitas oportunidades, e viabilizou alguns dos meus sonhos, somente por isso eu seria eternamente grata, mas além disso sempre foi uma grande amiga, e cuidou de mim como mãe, por isso levo a senhora no meu coração. Talvez esse não seja um agradecimento especial convencional, mas isso se deve a uma relação entre orientador- orientado, nada convencional e muito mais que especial.

À professora, doutora, co-orientadora, **Niege Araçari Jacometti Cardoso Furtado**, pelo carinho, pela paciência, pelos conhecimentos compartilhados e por toda nobreza em que se resumiu sua co-orientação, pois sem sua colaboração provavelmente eu não conseguiria atingir os objetivos pretendidos neste trabalho. A senhora viabilizou uma ideia e fez dela algo concreto, por isso a senhora, os meus mais sinceros agradecimentos.

Aos meus amados avôs paternos e padrinhos, **Paulo Cardoso de Godoy e Maria Helena Dias de Godoi**, por estarem presentes e me apoiarem nos meus projetos de vida, sem vocês esta vitória não teria a mesma importância.

Aos meus amados avôs maternos, **José Terossi (*in memoriam*) e Maria José Lopes Terossi**. Meu querido avô, infelizmente nos deixou fisicamente durante a execução deste trabalho, mas com certeza continuou zelando por mim em um lugar ao lado de Deus, por isso, agradeço aos dois (vô e vó), pelo apoio, pelos conselhos e pelas fundamentais orações em minha intenção para que eu me tornasse cirurgiã-dentista, mestre e agora doutora, sem as quais eu não teria vencido estas etapas de minha vida, vocês foram e são fundamentais para a conclusão deste trabalho.

Agradecimientos

*“Quem tem um amigo, mesmo que um só, não importa onde se
encontre, jamais sofrerá de solidão; poderá morrer de saudades, mas
não estará só”*

(Amir Klink)

À **Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto (FORP – USP)**.

Ao **FAPESP** pelo apoio financeiro para realização desta pesquisa em forma de bolsa (Processo n. 2011/23866-8) e auxílio à pesquisa para aquisição do espectrofotômetro modelo SP62S com Software Modelo QA Master I (X-Rite Incorporated - Neu-Isenburg Alemanha– Processo: 2012/08185-7),

Ao diretor e professor Dr. **Valdemar Mallet da Rocha Barros**, por sempre apoiar nossos projetos e viabilizar a execução dos mesmos.

Ao curso de pós-graduação em Reabilitação Oral, na pessoa da Prof. Dra. **Fernanda de Carvalho Panzeri** atual coordenadora, por assegurar nossos direitos e deveres com a pós-graduação.

Aos **professores do curso de pós-graduação em Reabilitação Oral** da FORP-USP, por seus ensinamentos durante o curso de Doutorado.

Aos **docentes e funcionários do Departamento de Materiais Dentários e Prótese** na pessoa da Profa. Dra. **Cláudia Helena Lovato da Silva**, chefe do departamento onde foi realizado este trabalho e que sempre viabilizaram nossas pesquisas.

Ao prof. **Javier Garcia Barbero**, da Universidad Complutense de Madrid pela oportunidade e orientação em meu estágio na Facultad de Odontología em Madrid em novembro/dezembro de 2012.

Ao prof. Dr. **Heitor Panzeri** e a profa. Dra. **Elza Helena Guimarães Lara**, pela colaboração imprescindível para a conclusão desta pesquisa.

À profa. Dra. **Andréa Cândido dos Reis** pelo carinho, pelas palavras enriquecedoras e pelos conhecimentos compartilhados.

À profa. Dra. **Silmara Aparecida Milori Corona** pelos conhecimentos compartilhados imprescindíveis para a elaboração desta dissertação e para a aquisição do auxílio à pesquisa originado desta tese.

À Profa. Dra. **Cláudia Helena Lovato da Silva**, que muito me ensinou durante os 9 anos que estou na FORP-USP.

À Profa. Dra. **Valéria Pagnano de Souza**, que sempre apoiou nossos projetos e que muito se empenhou para transmitir seus conhecimentos, nos ajudando muitas vezes com a estatística dos trabalhos.

À querida **Sra. Domiciana Benitez** pelo acolhimento e principalmente pelo carinho durante todo o tempo que nos conhecemos.

Aos estimados **Marcos Catirse e Marcos Daniel Elizaur Catirse** pela receptividade, atenção e carinho que sempre me dedicaram.

À amiga e “orientadora”, **Tatiane Cruz de Carvalho**, que tenho imenso carinho e admiração, pois além de amiga foi chave mestra para o desenvolvimento deste trabalho, pois seus conhecimentos e sua amizade me impulsionaram na direção correta para viabilizar esta pesquisa. Sempre me ajudou com os experimentos microbiológicos, me ensinando com paciência e carinho. À você Tati, meus mais sinceros muito obrigada!

Às amigas **Sônia Figueiredo e Daniele Fernandes**, pelos ensinamentos e pela ajuda inestimável nos experimentos de citotoxicidade, mas, não apenas por isso agradeço, pois a pesquisa não me deu apenas conhecimento, mas sim duas amigas que levarei para o resto da vida em meu coração.

À amiga, **Amanda Cavalheiro**, pelas trocas de conhecimentos que foram essenciais para meu crescimento como pesquisadora e também pela ajuda na parte prática desta pesquisa.

Às amigas, **Andressa Ristori de Francesco, Renata Guskuma, Fabiana Bastos Ribeiro, Fabrícia Anjos e Junaine Tomaz Alves** pela amizade que se iniciou na graduação e que tenho certeza que será para vida toda. Obrigada por me ouvirem nos momentos difíceis e por compartilharem dos momentos felizes da minha vida. Mesmo longe representam o verdadeiro significado da amizade.

À amiga, **Taiana de Melo Dias Leite**, pela amizade, companheirismo, oportunidades e confiança que se fortaleceu neste último ano de doutorado.

À querida amiga **Sarah Stefânia Jorge**, pela amizade, cumplicidade, paciência e pelas oportunidades que sempre me deu.

À pupila e amiga, **Lauren Bonher**, pela amizade, pela disponibilidade em me ajudar, pelo companheirismo, carinho competência e confiança.

Às amigas, **Marcela Salles** e **Tatiane R. Cunha** pela enorme amizade, que construímos principalmente este ano, vocês foram e são muito especiais na minha vida. Obrigada por tudo!

Às amigas, **Fabiana Mendonça**, **Mariana Nascimento** e **Lívia Bregagnolo**, pelos inesquecíveis momentos que vivemos e que ainda viveremos juntas.

À minha grande amiga/irmã angolana, **Carmen Dilene Andrade Fortunato**, pelo carinho, pela amizade e acima de tudo pelo companheirismo que sempre me dedicou, me ouvindo, me acalmando, e me apoiando em todos os meus projetos de vida, e que mesmo longe, sempre esteve muito presente.

Às amigas, **Nathanne Ferreira** e **Ludmila Lima**, obrigada por compartilhar comigo suas vidas e por serem especiais assim como são. Obrigada por me apoiarem na vida e nos estudos, pela amizade, pelos conhecimentos e principalmente pela cumplicidade que sempre tivemos.

Ao eterno amigo, **Diogo Rodrigues Cruvinel**, que tenho um imenso carinho. Obrigada por me ouvir, pelos conselhos, pela ajuda inestimável nestes anos todos que estivemos juntos e pelos momentos de alegria compartilhados.

Aos amigos e colegas de pós-graduação, **Vanessa Fagundes**, **Adriana Ribeiro**, **Fábio Aguiar**, **Daniela Felipucci**, **Ana Carolina Maito Vilella**, **Marina Pisani**, **Vítor**, **Murilo Pitta**, **Richard Honorato**, **Maurício Malheiros Badaró**, **Brahim Drubi Filho**, **Maria Paula Della Vecchia** e **Lourenço Roselino** pelos conhecimentos compartilhados, pelos trabalhos realizados e principalmente pela amizade.

Às amigas, **Lariça Barbosa Raimundo** e **Marcela Caffarena Junqueira Piantino**, pelo carinho, e que apesar de longe, continua imenso.

Aos inesquecíveis amigos, **Nádia Fernanda Sinoti** e **Wagner Pascoal de Andrade Antônio**, obrigada pelo carinho.

Ao amigo, **Rômulo Rocha Régis**, pela companhia em muitos momentos felizes e difíceis da minha vida, mas acima de tudo por ser um amigo tão especial.

À amiga **Daniela de Biagi Freitas**, pela amizade.

Aos amigos do laboratório de Farmacognosia, **Bruno Sampaio Leite**, **Cristiane Teixeira Vilhena Bernardes**, **Danniela Faleiro**, **Túlio Pessoa de Rezende**, **Federico Padilla**, **Ricardo Furtado**, **Marcela Etchebehere**, **Mariza Miranda**, **Juliana Costa**, que me acolheram com muita paciência para explicar as dúvidas que muitas vezes eram triviais, e principalmente pela amizade que nasceu desta troca de conhecimento.

Aos técnicos laboratoriais **Mário Sadati Ogasawara Poiani**, **Maria Angélica dos Santos Cunha Chellegatti**, **Rodrigo Silva** e **João Gabriel Curtolo**, os quais foram essenciais para o desenvolvimento desta pesquisa, pois além de transmitir seus conhecimentos, participaram na parte prática da pesquisa.

Aos meus amigos paraguaios **Mirtha Perdomo**, **Luis Delgado**, **David Ugarte Nuñez**, **Lourdes Maria Garcia**, pelas oportunidades que me propuseram, pelo imenso carinho, pela amizade, e pelo respeito.

Aos amigos, **Juliana Barchelli Pinheiro** e **Alan Lourenço** pela amizade.

Aos amigos **Glauce Nascimento** e **Adriano Marangoni** pela amizade inestimável e pelo carinho que sempre me dedicaram e que sem dúvidas é recíproco.

À graduanda, **Bianca Sobue**, pela colaboração nas imersões dos corpos de prova e, na pessoa da Bianca, gostaria de agradecer todos os alunos de iniciação científica que confiaram em mim e colaboraram para a minha formação.

Aos técnicos **Edson Volta, Ana Paula Macedo e Viviane de Cássia Oliveira** pela amizade e pelo auxílio na conclusão deste projeto.

Aos técnicos do Laboratório do Departamento de Materiais Dentários e Prótese: **José de Godoy Filho, Lício Firmino Júnior, Marcelo Aparecido Vieira, Fernando Schiavetto, Odair Rosa Silva, Eduardo Destito, Paulo César Teodoro e Paulo Sérgio Ferreira**, pela amizade, respeito, pela competência e dedicação ao trabalho em prótese que colaboraram com os resultados dos trabalhos clínicos e laboratoriais realizados por mim.

Às secretarias do Departamento de Materiais Dentários e Prótese: **Regiane Damasceno, Fernanda Talita de Freitas e Ana Paula Xavier** pelo carinho, pela amizade e pela colaboração em todo processo do curso de doutorado em Reabilitação Oral.

Às secretarias da Pós-Graduação: **Regiane Cristina Moi Sacilotto e Isabel Cristina Galino Sola** pela paciência e pela pronta disponibilidade em colaborar com o processo burocrático da pós-graduação.

Aos amigos, **Renata Cristina Rosa, Erik Jhonny Lopes e Laís Rosa** pela amizade constante na minha vida, sem vocês minha estada em Ribeirão Preto não seria tão especial.

Aos meus **tios e primos** que sempre me apoiaram no decorrer da minha carreira na odontologia. E, neste momento, agradeço especialmente ao meu tio **Antônio Terossi** e meu primo **Cristiano José Terossi** pela ajuda na conclusão deste trabalho.

Á **todos que contribuíram direta ou indiretamente para a realização deste trabalho**, meus sinceros agradecimentos.

Resumo

GODOI, A. P. T. **Estudo do Óleo essencial de *Casearia sylvestris* e da Formulação de Enxaguatório bucal. Caracterização química, Citotoxicidade, Potencial antimicrobiano e Efeito nas propriedades dos Materiais Odontológicos estéticos.** 2013. 210f. Tese (Doutorado) Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto.

Alguns estudos têm sido realizados sobre a associação de materiais restauradores odontológicos e soluções antissépticas, pois, em especial a clorexidina (CHX), além dos benefícios apresenta efeitos colaterais. Assim tornam-se necessários estudos de soluções alternativas tão eficazes quanto à CHX, porém sem os efeitos colaterais destas. Neste anseio, foi que se pesquisou *Casearia sylvestris* (CS) que é uma planta medicinal que oferece benefícios, mas, no entanto, pouco se sabe sobre o efeito desta sobre materiais restauradores estéticos (MRE) e algumas dúvidas permanecem sobre seu potencial antimicrobiano e sua toxicidade sobre células. O objetivo deste estudo foi avaliar as propriedades biológicas do óleo essencial (OE) de CS e o efeito deste sobre MRE. Assim, o OE foi obtido por hidrodestilação e caracterizado por Cromatografia a gás acoplada a Espectrometria de massas (CG-EM) e os valores de concentração inibitória e bactericida mínimas foram determinados pelo método de microdiluição frente às espécies *Streptococcus (mutans, mitis, sanguinis e salivarius)* e *Enterococcus faecalis*. Avaliou-se também a citotoxicidade do OE de CS e da formulação de enxaguatório bucal contendo o OE bioativo em fibroblastos de camundongos. Para a avaliação da rugosidade superficial (RS), cor, microdureza superficial (MS) e a análise qualitativa da superfície (Microscopia Eletrônica de Varredura - MEV) dos MRE submetidos às soluções em estudo, foram confeccionados 60 espécimes (n=10), 30 de cada MRE (resina composta e cimento de ionômero de vidro modificado por resina- CIV), os quais foram subdivididos em 3 grupos para serem submetidos: G1 - CHX, G2 - enxaguatório experimental a base do OE de CS e G3 - Água destilada. As leituras foram realizadas com os aparelhos adequados para cada um dos ensaios, após o polimento dos espécimes e após 24h do término do período experimental. Os resultados obtidos foram avaliados de acordo com os Conceitos da Estatística Clássica, após análise exploratória dos dados. O rendimento do OE obtido foi 0,85mL/100g folhas secas; os constituintes majoritários detectados e identificados no OE foram o β -cariofileno, germacreno-D, biciclogermacreno, δ -cadideno, óxido de cariofileno, espatulenol e α -elemol; o OE e a formulação de enxaguatório desenvolvida apresentaram atividade antimicrobiana significativa frente aos micro-organismos testados,

exceto para o OE contra *Enterococcus faecalis*; o OE nas diferentes concentrações testadas e a formulação de enxaguatório apresentaram citotoxicidade frente a fibroblastos gengivais L929 menor estatisticamente que a CHX; a citotoxicidade do OE é tempo-dependente; a formulação desenvolvida proporcionou maior alteração de cor para a resina Z250 do que a CHX e a água destilada, sendo essa mudança em função do Tempo nos parâmetros de cor (L^* , a^* e b^*) analisados isoladamente, enquanto que para o CIV não houve diferença estatisticamente significativa para a cor sob as diferentes soluções testadas; as soluções em estudo não tiveram efeito significativo sobre a RS da resina composta, enquanto que para o CIV houve um aumento estatisticamente significativo na RS quando o mesmo foi submetido a CHX; não houve diferença estatisticamente significativa na MS de ambos os MRE testados; e o MEV mostrou deteriorações superficiais principalmente nos corpos de prova de CIV submetidos a CHX.

Palavras-chave: 1. *Casearia sylvestris*. 2. Atividade antimicrobiana. 3. Citotoxicidade. 4. Materiais restauradores. 5. Enxaguatório bucal.

Abstract

GODOI, A.P.T. **Study of CS essential oil and Formulation of mouthwash. Chemical characterization, cytotoxicity, and antimicrobial potentia, effect on the properties of Dental Materials aesthetic.** 2013. 210 p. Thesis (Doctor's Degree in Oral Rehabilitation). Ribeirão Preto School of Dentistry, University of São Paulo, Brazil.

Researches has been developed associating dental material and mouthwashes, due to the side effects caused presenting in the products, especially chlorhexidine (CHX). Therefore, it becomes necessary studies involving alternative solutions containing the CHX efficacy, but without its collateral effects. Regarding to this, it was studied the specie *Casearia sylvestris* (CS), a medicinal plant with confirmed benefits, although its effect on dental materials (DM) it is poorly studied (described, talvez fique melhor) and its antimicrobial potencial and cytotoxicity remains controversial. The aim of this study was to evaluate the biological properties of CS essential oil and its effect on DM. The CS essential oil was obtained and characterized through gas chromatography coupled to mass spectrometry (GC-MS). The minimum inhibitory concentration and minimum bactericidal concentration values were determined using the microdilution of *Streptococcus* species (*mutans*, *mitis*, *salivarius* and *sanguinis*) and *Enterococcus faecalis*. It was also evaluated the cytotoxicity on mouse fibroblasts of both essential oil and mouthwash formulation containing the bioactive essential oil. To the superficial roughness, color, superficial microhardness and surface qualitative analysis (Scanning electron microscope – SEM) of DM submitted to studied solutions, it was prepared 60 specimens (n = 10), 30 of each DM (composite resin, resin modified glass ionomer- CIV), which were subdivided into 3 groups to the submission: G1 – CHX, G2 – mouthwash containing CS essential oil and G3 – distilled water. The lectures were performed with appropriate equipments(apparatus, acho que fica melhor): posteriorly specimens polishing and 24h after the experimental period end. The obtained results were evaluated according to the classical statistics concepts, after data exploratory analysis. The yield of essential oil obtained was 0.85 mL/100 g dried leaves; the major constituents detected and identified in the essential oil were β -caryophyllene, germacrene-D, bicyclogermacrene, δ -cadideno, caryophyllene oxide, α -and spathulenol elemol; both mouthrinse containing essential oil as the formulation developed showed significant antimicrobial activity against the tested microorganisms, except *Enterococcus faecalis*; the different concentrations tested of the essential oil and the mouthwash formulation showed statistically lower cytotoxicity against gingival fibroblasts L929 than CHX; cytotoxicity essential oil is time-dependent; the formulation provided higher color change to resin Z250 when compared with CHX and

distilled water, and this change occurred in the factor time of all color parameters (L^* , a^* and b^*) when analyzed alone, while to CIV color the difference was not statistically significant for the different solutions studied, there was a statistically significant increase in CIV surface roughness when submitted to CHX, while to composite resin the difference was not statistically significant; there was no statistically significant difference in microhardness of both restorative materials tested, and SEM showed surface deterioration mostly in the specimens submitted to CHX .

Key words: 1. *Casearia Sylvestris*. 2. Antimicrobial activity. 3. Cytotoxicity. 4. Restorative materials. 5. Mouthwash.

Sumário

1 INTRODUÇÃO	43
2 REVISÃO DA LITERATURA	49
2.1 <i>Casearia sylvestris</i>	49
2.2 Citotoxicidade de enxaguatórios bucais disponíveis no mercado	61
2.3 Atividade antimicrobiana de enxaguatórios bucais disponíveis no mercado	65
2.4 Ação dos enxaguatórios bucais disponíveis no mercado sobre as propriedades dos materiais restauradores odontológicos	68
3 PROPOSIÇÃO	75
4 MATERIAL E MÉTODO	79
4.1 Procedimentos Fitoquímicos	79
4.1.1 Material vegetal	79
4.1.2 Obtenção do óleo essencial	80
4.2 Análise do óleo essencial por Cromatografia a gás acoplada à Espectrometria de massas	81
4.3 Avaliação da Atividade Antimicrobiana do óleo essencial da <i>Casearia sylvestris</i>	82
4.3.1 Micro-organismos que foram utilizados nos ensaios	82
4.3.2 Determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM)	82
4.3.2.1 Preparo do inóculo	82
4.3.2.2 Preparo das amostras	83
4.3.2.3 Preparo do antibiótico padrão	83
4.3.2.4 Realização da técnica	83
4.3.3 Determinação da Concentração Bactericida Mínima (CBM)	84
4.4 Citotoxicidade do óleo essencial	87
4.4.1 Cultura de Células de Fibroblastos de Camundongos (L929)	87
4.4.2 Tripsinização	87
4.4.3 Plaqueamento	89
4.4.4 Preparo e adição das amostras	90
4.4.5 Leitura das microplacas	91
4.5 Desenvolvimento de Formulação de enxaguatório bucal contendo óleo essencial de <i>Casearia sylvestris</i>	93
4.6 Avaliação da atividade antimicrobiana do enxaguatório bucal à base do óleo essencial de <i>Casearia sylvestris</i>	93

4.7 Curva de morte	93
4.7.1 Micro-organismos que foram utilizados nos ensaios.....	93
4.7.2 Determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM)	94
4.7.3 Preparo das amostras e solução padrão	94
4.7.4 Realização da técnica.....	94
4.8 Citotoxicidade do Enxaguatório Bucal à base do óleo essencial de <i>Casearia sylvestris</i> ..	96
4.9 Ensaios de Alteração de cor, Rugosidade superficial e Microdureza superficial de materiais odontológicos estéticos submetidos ao enxaguatório experimental à base de óleo essencial de <i>Casearia Sylvestris</i>	96
4.9.1 Delineamento Experimental	96
4.9.2 Delineamento estatístico	97
4.9.3 Obtenção dos corpos de prova de resina composta	97
4.9.4 Obtenção dos corpos de prova do Cimento de Ionômero de Vidro Tipo II	99
4.9.5 Leituras	100
4.9.5.1 Leituras Alteração de cor	100
4.9.5.2 Leitura da Rugosidade Superficial	102
4.9.5.3 Leitura de Microdureza Superficial	103
4.9.6 Imersão dos corpos de prova	104
4.10 Análise superficial qualitativa por meio de um Microscópio Eletrônico de Varredura (MEV) dos materiais odontológicos estéticos submetidos ao enxaguatório bucal experimental de <i>Casearia Sylvestris</i>	105
5 RESULTADOS.....	109
5.1 Rendimento do processo de obtenção do óleo essencial	109
5.2 Análise dos constituintes do óleo essencial de <i>Casearia sylvestris</i> por Cromatografia a gás acoplada à Espectrometria de massas (CG/EM)	109
5.3 CIM e CBM para o óleo essencial da <i>Casearia sylvestris</i>	110
5.4 Citotoxicidade do óleo essencial de <i>Casearia sylvestris</i>	111
5.5 Concentração Inibitória Mínima e Concentração Bactericiada Mínima do enxaguatório	114
5.6 Curva de morte	115
5.7 Citotoxicidade do Enxaguatório a base de óleo essencial de <i>Casearia sylvestris</i>	116
5.8 Alteração de cor dos materiais restauradores estéticos	118
5.8.1 Resina composta	118
5.8.1.1 Delta E (ΔE^*).....	120
5.8.1.2 Parâmetro L*	121
5.8.2 Parâmetro b*	127

5.8.3 Cimento de Ionômero de vidromodificado por resina	130
5.8.3.1 Delta E (ΔE^*)	131
5.9 Rugosidade Superficial dos materiais restauradores estéticos.....	132
5.9.1 Resina composta.....	132
5.9.2 Cimento de Ionômero de vidro modificado por resina	135
5.10 Microdureza Superficial dos materiais restauradores estéticos	140
5.10.1 Resina composta.....	140
5.10.2 Ionômero de vidro modificado por resina	143
5.11 Microscopia Eletrônica De Varredura (MEV).....	146
5.11.1 Resina composta.....	147
5.11.2 Cimento de Ionômero de Vidro Modificado por Resina.....	150
 6 DISCUSSÃO.....	 155
6.1 Obtenção do óleo essencial.....	155
6.2 Análise do óleo essencial por cromatografia a gás acoplada à espectrometria de massas	156
6.3 Avaliação da atividade antimicrobiana do óleo essencial e do enxaguatório a base de óleo essencial de <i>Casearia sylvestris</i>	157
6.4 Análise da citotoxicidade do óleo essencial e do enxaguatório a base de óleo essencial de <i>Casearia sylvestris</i>	160
6.5 Formulção do enxaguatório a base de óleo essencial de <i>Casearia sylvestris</i>	164
6.6 Análise dos materiais restauradores odontológicos submetidos ao enxaguatório experimental a base de óleo essencial de <i>Casearia sylvestris</i>	167
6.6.1 Alteração de cor	167
6.6.2 Rugosidade superficial	169
6.6.3 Microdureza superficial.....	170
6.6.4 Microscopia Eletrônica de Varredura	171
 7 CONCLUSÕES.....	 175
 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	 179
 APÊNDICES	 195

Introdução

1 INTRODUÇÃO

A odontologia vem se desenvolvendo cada dia mais, criando e transformando produtos buscando não somente o tratamento do paciente, mas a manutenção do tratamento realizado (GODOI, 2009) e a prevenção de futuras doenças (KÖHLER e ANDRÉEN, 2010). Assim, vários materiais restauradores estéticos têm sido criados para melhorar o desempenho destes, tanto no aspecto da estética quanto no funcional. No entanto, estes materiais ainda se deterioram na presença de alguns fatores da cavidade bucal (SETTEMBRINI et al., 1995) como os agentes antissépticos (TRAUTH et al., 2012) e bebidas consumidas pelos pacientes (ERTAS et al., 2006; LEE e POWERS, 2007; GODOI, 2009).

Outro campo no qual a odontologia preventiva e curativa vem atuando é no campo dos antissépticos. O uso do agente quimioterapêutico antimicrobiano tem sido proposto como um meio de reduzir os níveis de bactérias bucais, especificamente *Streptococcus mutans* (PRASANTH, 2011) que adere na superfície dental e inicializa a descalcificação do esmalte por produzir ambiente ácido através da degradação de carboidratos (FARGE, 1998). Além de *Streptococcus mutans*, outras bactérias são patogênicas e participam do processo cariogênico, tais como: *Streptococcus salivarius*, *Streptococcus mitis*, *Streptococcus sanguinis* (CHAVA et al., 2012) *Enterococcus faecalis* (KOUIDHI et al., 2011) e *Lactobacilos casei* (RAMALINGAM et al., 2012). No entanto, produtos para saúde oral devem tentar controlar os níveis da placa, sem removê-la, de modo a reter as propriedades benéficas da microflora residente bucal (MARSH, 2010; MARSH, 1992), além disso, o antisséptico bucal deve ser biocompatível, sendo a toxicidade um dos parâmetros cruciais para avaliação de resposta biológica do potencial lesivo que causa a morte de células ou tecido (SIQUEIRA GONÇALVES et al., 2008; PITHON et al., 2011). Sendo assim, vários produtos têm sido pesquisados e desenvolvidos, visando oferecer mais benefícios e menos efeitos colaterais aos antissépticos. Diante disso, muitos pesquisadores como Shapiro et al. (2002) e Faria Júnior (2005) vêm estudando os agentes fitoterápicos buscando a resposta para essa necessidade evolutiva.

Um dos antissépticos mais utilizados na odontologia é a clorexidina, criada no final dos anos 40, quando cientistas desenvolvendo agentes antimalária, formularam um grupo de compostos denominados polibiguanidas, o qual demonstrou um amplo espectro antimicrobiano (BARDAL, 2005), ser pouco tóxica, mas apresentou efeitos colaterais que

dificultam o uso de longa duração (ALMEIDA, 2001; FARIA JÚNIOR, 2005). Com isso, torna-se imprescindível a busca de terapias alternativas (FARIA JÚNIOR, 2005) que possam atuar como antissépticos bucais para o combate à cárie, gengivite, periodontite ou ainda como desinfetantes de próteses.

Assim, o uso de agentes fitoterápicos de uma forma geral, constitui uma forma de terapia alternativa que vem crescendo, notadamente nos últimos anos (FARIA JÚNIOR, 2005), sendo muito utilizada na medicina e na odontologia (DUARTE et al., 2009). No entanto, nosso país não tem uma atuação destacada no mercado mundial de fitoterápicos, ficando inclusive atrás de países menos desenvolvidos tecnologicamente (YUNES, PEDROSA e CECHINEL, 2000).

A *Casearia sylvestris*, de interesse neste estudo, é uma planta medicinal que oferece uma vasta gama de utilizações como: antissépticos, antiulcerativo, diurético, tônico, estimulante, antimicrobiano, depurativo (SILVA, ALMEIDA e SOUSA, 2004) e ainda pode ser efetiva contra algumas linhagens de células tumorais (de MESQUITA et al., 2009; FERREIRA et al., 2010). A *Casearia sylvestris* é muito comum na América tropical e 70 espécies do gênero *Casearia* são comuns no Brasil (LE COINTE, 1934; SCHOENFELDER et al., 2008) tendo vários nomes populares entre eles: "guaçatonga" (SILVA, ALMEIDA e SOUSA, 2004; CURY, 2005; FERREIRA et al., 2010; PRIETO et al., 2012), "herva de brugre" (CURY, 2005; FERREIRA et al., 2010), "pau de lagarto", "erva de pontada" ou "chá de bugre" (CURY, 2005).

A *Casearia sylvestris* é uma planta arbórea, da família Flacourtiaceae, cujas folhas apresentam pontos translúcidos correspondentes às glândulas de óleo essencial (SCAVONE et al., 1979; SILVA et al., 1988). Algumas pesquisas (TANINIS et al., 2006; SCHNEIDER et al., 2006), avaliaram a composição química deste óleo, no entanto, existem poucos estudos documentados na literatura sobre os efeitos terapêuticos do óleo essencial de *Casearia sylvestris*, assim, algumas propriedades estudadas apontam para uma atividade anti-inflamatória, antiulcerativa (ESTEVES et al., 2005), citotóxica seletiva contra algumas linhagens de células tumorais (DA SILVA et al., 2008) e antimicrobiana, em baixas concentrações, frente as bactérias *Enterococcus faecalis*, *Escherichia coli*, *Micrococcus* e *Staphylococcus epidermitis* (SCHNEIDER et al., 2006).

Na odontologia a *Casearia sylvestris* tem sido estudada como uma alternativa para tratamento endodôntico (SILVA, ALMEIDA e SOUSA, 2004; DUARTE et al., 2009), contra o herpes labial (CURY, 2005) e na composição de dentifrícios (ARANTES, 2002). Estudos têm relatado que o extrato de *Casearia sylvestris* apresenta ação antimicrobiana contra *S.*

mutans quando as folhas são coletadas em agosto (época de floração) e essa atividade se encontra na fração obtida em acetato de etila (FARIA JÚNIOR, 2005). Também há estudos sobre sua ação contra o vírus do herpes e tem-se que os cremes de *Casearia sylvestris* induzem a uma cicatrização significativamente maior que o creme de penciclovir, pois um tempo menor é necessário para a cicatrização total destas lesões (CURY, 2005).

As plantas são mundialmente empregadas na medicina popular e apesar do uso indiscriminado das mesmas, até o momento são escassos os estudos sobre suas constituições químicas e atividades biológicas (CARVALHO, 2009), bem como de suas ações sobre materiais odontológicos para que possam ser utilizadas como possíveis antissépticos bucais.

Assim, foi realizado este estudo *in vitro* para avaliar a ação do óleo essencial de *Casearia sylvestris* sobre micro-organismos bucais, fibroblastos gengivais e materiais odontológicos estéticos.

Revisão da Literatura

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 *Casearia sylvestris*

Silva et al. (1986), determinaram a dose letal média (DL_{50}) e os efeitos em útero isolado de ratas, dos extratos brutos das folhas de *Casearia sylvestris*. Para isso, 3 tipos de extratos foram utilizados: aquoso a frio, aquoso a quente e etanólico a quente. Cada grupo de 10 camundongos foram injetados com um dos extratos aquosos quente de *C. sylvestris* nas doses de 3,0 – 2,5 – 2,0 – 1,5 e 1,0g/kg via intraperitoneal, observando-se o número de óbitos por grupo no período de 24 horas. Além disso, avaliaram as respostas contráteis máximas e a dose efetiva média (DE_{50}) após variarem a concentração dos extratos. Com a solução aquosa do extrato etanólico, observaram na motilidade espontânea uterina, aumento da frequência de contração e do tônus basal e diminuição da amplitude de contração; na curva dose-resposta à ocitocina observaram diminuição da resposta máxima e aumento da DE_{50} . O extrato aquoso a frio produziu, na motilidade espontânea uterina, aumento de todos os parâmetros observados; na curva-dose-resposta à ocitocina, também aumentou a resposta máxima, diminuindo, entretanto, a DE_{50} .

Basile et al. (1990), investigaram a atividade preventiva antiulcerativa do extrato bruto seco da folha de *Casearia sylvestris* brasileira quando administrada por via oral usando 2 modelos animais e concomitantemente testaram o potencial toxicológico dele. Para isso, a planta seca foi pulverizada/picada e extraída com 75% de etanol em solução hidroalcoólica à temperatura ambiente por métodos de maceração e percolação. As medidas do volume, pH, ácido hidrocloreídrico na secreção gástrica, o valor LD_{50} , a indução gástrica aguda por estresse e a toxicidade foram estudadas de acordo com os métodos já consagrados na literatura. Também foi observado o padrão de comportamento dos animais, incluindo alguns sintomas do estereótipo, diarreia, piloereção, mudanças na locomoção espontânea, convulsões e estado de alerta. Desta forma, os autores concluíram que este estudo dá suporte experimental ao uso na medicina folclórica de *Casearia sylvestris* como uma droga antiulcerativa, mas não permite o estabelecimento do componente natural responsável por essa atividade.

Ruppelt et al. (1991) verificaram a ação analgésica e anti-inflamatória de algumas espécies vegetais selecionadas. Rizzini, Mors e Pereira (1988) prepararam uma lista com 84

espécies de plantas usadas no Brasil como antiofídicas e, a partir desta lista algumas espécies foram selecionadas e testadas para atividade analgésica (número de contorções) e atividade anti-inflamatória (corante azul de Evans - solução a 1%) de acordo com a técnica de Whittle (administração intraperitoneal de ácido N-acético 0,1 0,1 ml/10 g) em ratos. Ruppelt et al. administraram por via oral uma infusão de 10% (planta seca) ou 20% (planta fresca) correspondendo a 1 ou 2g/kg de *Apuleia leiocarpa*, *Casearia sylvestris*, *Brunfelsia uniflora*, *Chiococca brachiata*, *Cynara scolymus*, *Dorstenia brasiliensis*, *Elephantopus scaber*, *Marsypianthes chamaedrys*, *Mikania glomerata* e *Trianosperma tayuya*. Com isso eles demonstraram atividades analgésicas e/ou anti-inflamatórias de intensidade variada para os diferentes tipos de plantas, sendo que, a *C. sylvestris* apresentou ação analgésica, mas a ação anti-inflamatória não foi tão forte quanto da alcachofra.

De Carvalho et al. (1998) isolaram novos diterpenos clerodânicos do tipo casearinas. Além do conhecido diterpeno casearina G (1), dois novos diterpenos clerodânicos do tipo casearinas, casearina S (2) e casearina T (3), foram isolados a partir de um extrato bioativo das folhas de *Casearia sylvestris*. Os diterpenos 1-3 apresentaram atividade moderada, mas seletiva, para o reparo de DNA deficiente de levedura de *Saccharomyces cerevisiae* mutantes RAD 52YK e RS 321.

Sertié et al. (2000) investigaram a atividade preventiva e curativa antiúlcera de três extratos preparados das folhas secas e frescas da *C. sylvestris*. Para o experimento, o extrato bruto das folhas secas foi obtido por percolação (Basile et al., 1990). As folhas secas foram extraídas com etanol a 75%, em solução hidroalcolica por maceração. A determinação do volume, pH e HCl na secreção gástrica foi estudada de acordo com o método de Basile et al. (1990) com grupo de 6 animais em jejum por 30 horas, também a lesão gástrica aguda induzida por estresse foi estudada pelo método descrito por Basile et al. (1990), já a lesão gástrica crônica foi estudada de acordo com o método descrito por Bacchi et al. (1995). Assim, os autores verificaram que o extrato bruto de folhas secas e frescas de *C. sylvestris* protege a mucosa estomacal dos ratos, sem mudanças no pH ácido, e esse efeito protetor é mais efetivo com o extrato bruto de folhas frescas. Em úlceras crônicas, o efeito curativo de ambos os extratos faz reduzir o tamanho da úlcera e aumentar o número de colágeno. Este efeito curativo é muito similar com ambos os extratos.

Espindola et al. (2004) realizaram fracionamento biomonitorado do extrato hexânico da casca da raiz de *C. sylvestris* var. *língua* o que levou ao isolamento de um novo diterpeno clerodânico. Este composto mostrou atividade pronunciada sobre *Trypanosoma cruzi*, o

agente causal da doença de Chagas, com a concentração inibitória mínima (CIM) de 0,59 µg/mL.

Maistro et al. (2004) investigaram os efeitos genotóxicos de um extrato etanólico bruto de *C. sylvestris* sob cultura de células hepáticas (células HTC) de *Rattus norvegicus* e células V79 de hamster chineses, usando o ensaio cometa. Para a avaliação da atividade genotóxica as células foram tratadas com três concentrações diferentes (0,5, 1 e 2 mg/ml) de extrato preparado a partir de uma dose de 25 mg/ml de solução aquosa. O controle positivo foi a ciclofosfamida para células HTC e metanossulfonato de metil para células V79. Os resultados mostraram que o extrato de *C. sylvestris* não apresentou efeitos genotóxicos e não potencializou os danos no DNA induzidos pela ciclofosfamida e metanossulfonato de metil em células HTC e V79, respectivamente. Este estudo corrobora com o de Sertié et al. (2000) quanto a análise qualitativa dos extratos, e adicionalmente revela a presença de flavonóides que foram quantificados a 0,013%.

Sassioto et al. (2004) estudaram o efeito do decocto a 5% de *C. sylvestris* no reparo de defeito femoral preenchido com matriz óssea bovina desvitalizada. Para este estudo 24 ratos foram divididos em 2 grupos. Defeitos femorais bilaterais, com 2 mm de diâmetro foram produzidos na diáfise femoral e preenchidos com matriz óssea bovina desvitalizada. O grupo experimental recebeu 1ml de decocto 5% de *C. sylvestris*; o grupo controle recebeu 1ml de água destilada. Os animais foram sacrificados com 10, 20 e 30 dias e o tecido ósseo presente na área operada foi quantificado. Fez-se a decocção de 1g de folhas pulverizadas de *C. Sylvestris* em 20 ml de água destilada, e submeteu-se o decocto a análise qualitativa por cromatografia em camada delgada para confirmação da presença de flavonóides, saponinas e taninos; o doseamento dos flavonóides rutina e quercetina foi feito por cromatografia líquida de alta eficiência. Cortes histológicos de quatro micras foram corados com hematoxilina-eosina e submetidos à avaliação histológica com utilização de microscópio óptico acoplado a conjunto para fotomicrografia. Com isso, os autores concluíram que o decocto a 5% de *C. Sylvestris* promove atraso na cronologia do processo de reparação óssea e menor osteogênese em defeitos ósseos preenchidos com matriz óssea bovina desvitalizada, em ratos, na dose e períodos estudados.

Silva et al. (2004) avaliaram o potencial irritativo de propólis, de *C. sylvestris*, de Ostoporin e de soro fisiológico (controle) em ratos. Para isso, foram utilizados 28 ratos, os quais receberam injeção do corante azul de Evans (2%) e, em seguida, receberam 0,1 ml das substâncias teste. Os animais foram sacrificados meia, 1, 3 e 6 horas após a injeção das substâncias, e os materiais coletados (exudato inflamatório) foram submetidos à análise em

espectrofotômetro. Assim, os autores verificaram que Otoporin mostrou ser menos efetivo como fármaco anti-inflamatório e, tanto própolis como *C. sylvestris* podem ser utilizados como uma alternativa no tratamento endodôntico.

Cury (2005) avaliou a eficácia de cremes à base de tintura de *Casearia sylvestris* a 10% e de *C. sylvestris* (medicamento fitoterápico) dinamizada em 3DH (medicamento homeopático) no tratamento de lesões herpéticas, comparando-os com creme de Penciclovir a 1% (Penvirlabia - Sigma Lab.). Foi realizado um estudo duplo-cego, com amostra de 93 voluntários, que apresentavam lesão herpética labial. Foram formados três grupos, sendo que cada um destes utilizou um dos medicamentos estudados. Os voluntários foram acompanhados até a cicatrização total da lesão. Os resultados demonstraram que os cremes de *C. sylvestris* induziram a uma cicatrização significativamente maior do que o creme de Penciclovir, pois foi menor a quantidade de dias, necessários para a cicatrização total das lesões. Foi possível considerar a utilização dos medicamentos fitoterápico e homeopático, como uma alternativa ao tratamento convencional, tendo como principais vantagens a eficácia demonstrada e o baixo custo.

Esteves et al. (2005) investigaram as atividades antiúlcera e anti-inflamatória do óleo essencial de folhas de *C. Sylvestris* (EOCS). Para investigar essas atividades os seguintes testes foram utilizados: edema de pata, teste de tecido granulomatoso, permeabilidade vascular, teste de contorção, úlcera gástrica induzida pelo estresse e avaliação da secreção gástrica. O óleo essencial foi obtido por aparelho de Clevenger (hidrodestilação, e os componentes do óleo foi avaliado pelo sistema Finnigan CG/EM. Assim, o rendimento total de EOCS foi de 2,5%, e LD₅₀ de 1100 mg/kg no rato. Os principais compostos identificados por cromatografia a gás acoplada a espectrometria de massas foram cariofileno (13,8%), thujopsene (5,2%), alfa-humuleno (3,7%), beta-acoradiene (20,8%), germacreno-d (1,9%), biciclogermacreno (40,9%), calamenene (1,5%), germacreno B (3,9%), espatulenol (12,6%) e globulol (2,2%). O EOCS administrados (125 mg/kg) resultou em 36% de inibição em edema induzido por carragenina no ensaio da pata de rato. No entanto, tanto o edema da pata induzido por dextrana quanto o ensaio de permeabilidade vascular usando histamina não mostrou inibição significativa. Animais submetidos ao teste de contorção, por meio de ácido acético, apresentaram 58% e 56% de inibição em contorções com EOCS e indometacina, respectivamente. Além disso, EOCS inibiu 90% da úlcera gástrica induzida por tensão, enquanto que a cimetidina inibiu 70%. O volume de secreção gástrica no grupo tratado com EOCS foi maior do que o grupo tratado com a cimetidina. Os EOCS também não mostraram mudanças relacionadas com os níveis de H⁺ na secreção gástrica. Com os resultados globais

obtidos neste estudo os autores sugerem uma atividade anti-inflamatória para os EOCS de *C. sylvestris* além de sua atividade antiúlcera.

Mesquita et al. (2005) avaliaram trinta e um extratos de 13 plantas medicinais do cerrado brasileiro *in vitro* para testar sua atividade antiprotozoária contra as formas promastigotas de *Leishmania donovani*, e amastigotas de *Trypanosoma cruzi*. Entre as plantas selecionadas, *C. sylvestris* var. *língua* foi a mais ativa, tanto contra *L. donovani*, quanto para *T. cruzi*. Quinze extratos foram ativos contra promastigotas de *L. donovani* com concentrações de 50% de inibição do parasita de crescimento (IC₅₀) entre 0,1-10 mcg / ml, em particular aqueles de *Annona crassiflora* (Annonaceae), *Obovatus himatanthus* (Apocynaceae), *Kunthiana guarea* (Meliaceae), *Cupania vernalis* (Sapindaceae), e *Serjania lethalis* (Sapindaceae). Em relação à amastigotas de *T. cruzi*, extratos de *A. crassiflora*, *Duguetia furfuracea* (Annonaceae), e *C. sylvestris* var. *Língua* apresentaram atividade com valores de IC₅₀ entre 0,3-10 µg/ml.

Taninis et al. (2006) avaliaram a composição do óleo essencial em folhas de uma população de *C. Sylvestris*. Os autores coletaram amostras de 12 indivíduos, ao amanhecer (7 horas) e no período da tarde (15 horas). O óleo extraído foi analisado por meio de CG-EM e CG-DIC, em triplicata. Assim, verificou-se variação na composição do óleo em função do período da amostragem. Pela manhã, os constituintes principais detectados foram longifoleno (1,8%), β-selineno (4,2%), germacreno-D (79,2%) e germacreno- B (14,8%). À tarde, os constituintes principais foram identificados como: longifoleno (3,2%), β-gurgeneno (1,1%), γ-muuruleno (3,0%), γ-gurjeno (2,2%), β-selineno (5,2%), germacreno-D (66,2%), biciclogermacreno (3,6%), δ-cadineno (1,7%), germacreno- B (13,7%). Rearranjos dos sesquiterpenos monocíclicos (germacreno- B e germacreno-D), possivelmente induzidos fotoquimicamente, podem explicar a formação dos sesquiterpenos longifoleno, β-gurjeneno, γ-muuruleno, γ- gurjeneno, β-serlineno, biciclogermacreno, δ-cadineno. Sendo assim, verificou-se que a dinâmica metabólica é influenciada pelo fotoperíodo.

Rodrigues et al. (2006) avaliaram 190 extratos hexânicos e etanólico de 27 espécies de plantas do cerrado do Brasil para verificar a atividade larvicida contra o terceiro estágio das larvas de *Aedes aegypti* a 500 µg/ml. Quatorze extratos de 7 espécies apresentaram atividade (> 65% de mortalidade) contra as larvas. Destes *Dugeutia furfuracea*, *Piptocarpha rotundifolia*, *C. sylvestris* var. *língua*, *Serjania lethalis* e *Xylopia aromática* foram ativos em 56,6, 162,31, 232,4, 285,76 e 384,37 g/ml, respectivamente. *Annona crassiflora* e *Cydistax antisiphilitica* mostraram atividade em 23,06 e 27,61 g/ml. Neste trabalho em questão, as propriedades larvicidas destas espécies foram descritas pela primeira vez.

Schneider et al. (2006) objetivaram determinar a composição química do óleo volátil da *C. sylvestris* e sua atividade antimicrobiana. Para extração do óleo, utilizou-se o aparelho de Clevenger, obtendo-se cerca de 0,6% de óleo, o qual foi submetido à análise em CG. Para a atividade antimicrobiana o método utilizado foi a bioautobiografia, onde os micro-organismos *Enterococcus faecalis* (ATCC 29212), *Escherichia coli* (ATCC 25922), *Micrococcus sp.* (isolado), *Shigella flexnerii* (isolado), *Enterobacter sp.* (isolado), *Staphylococcus epidermitis* (isolado), *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923) e *Salmonella sp.* (isolado), foram testados frente ao óleo de *C. sylvestris*, sendo utilizado como controle positivo o Cloranfenicol. Com isso foi possível determinar que 90% dos constituintes presentes no óleo volátil da espécie apresentaram atividade antimicrobiana. Os compostos majoritários determinados foram α -cariofileno (27,5%) e biciclogermacreno (24,2%). Os monoterpenos (4,7%) se encontram em pequena quantidade neste óleo, sendo que β -pineno (2,0%) é o principal monoterpeno determinado. Este óleo inibiu todos os micro-organismos testados, porém, foi mais eficaz contra bactérias Gram-positivas. O óleo apresentou maior atividade (1,3mg) frente as bactérias *Enterococcus faecalis*, *Escherichia coli*, *Micrococcus sp.* e *Staphylococcus epidermitis*. Sendo assim, devido à baixa concentração para inibir as bactérias citadas, o uso do óleo de *C. sylvestris* torna-se uma alternativa contra esses micro-organismos.

Cintra-Francischinelli et al. (2008) objetivaram avançar na identificação dos compostos das folhas de *C. sylvestris* que tem ação antiofídica. Os extratos foram obtidos a partir de folhas de *C. sylvestris* usando diferentes solventes (Hexano (HE), diclorometano (DME), acetato de etila (EAE) e metanol (ME)) devido as diferentes polaridades dos componentes das folhas da *C. sylvestris*. Utilizou-se neste experimento os seguintes ensaios: Cromatografia em camada delgada (TLC), cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC), preparação muscular nervo frênico-diafragma de rato (PNDP), estudo histológico e quantitativo. O rendimento em porcentagem obtidos dos extratos expresso em g% foram: HE (3.02); DME (2.33); EAE (3.48); ME (8.42). Assim os autores concluíram que os resultados indicam que ME de *C. sylvestris* possui um princípio farmacologicamente bioativo capaz não só de aumentar a liberação de acetilcolina, mas também de neutralizar o bloqueio neurotóxico evocado pelo veneno Bjsu e BthTX-I.

Da Silva et al. (2008) objetivaram encontrar, isolar e identificar as substâncias que podem ser associadas com a capacidade de *C. sylvestris* inibir a formação de edema, e atividades enzimáticas e miotóxicas causadas por *B. jararacussu* e *B. jararacussu* PLA₂ (Asp 49 BthTX-II). Os valores da constante de inibição (K_i) para a atividade enzimática, bem como os valores de IC₅₀ encontrados nas atividades edematogênica e miotóxica, indicam que o

ácido elágico, um dos constituintes isolados e identificados é o melhor inibidor destas atividades. Os resultados deste estudo mostram que a presença de grupos hidroxílicos na posição 3 ou 3' aumenta a capacidade das substâncias identificadas inibirem os efeitos tóxicos. No entanto, a presença de grupos metoxílicos na posição 3 ou 3' reduziu, mas não inibiu completamente a capacidade dos constituintes inibirem todos os efeitos tóxicos estudados.

Schoenfelder et al. (2008) avaliaram o efeito antihiperlipidêmico do extrato metanólico de *C. sylvestris* (MCE) de acordo com Shimoda et al. 2003. Camundongos foram divididos em cinco grupos (n = 6). Grupos I-II, foi utilizado como controle e recebeu o veículo (controle negativo) ou o veículo adicionado de óleo de oliva (hiperlipidêmico). Grupo III recebeu MCE, nas doses de 125, 250 e 500 mg/kg via oral. Grupo IV recebeu Orlistat (Xenical), e grupo V, fenofibrato nas doses de 125, 250 e 500 mg/kg via oral, como uma fina suspensão aquosa. O óleo (dose de 5 ml / kg por via oral) foi administrado 30 min após o tratamento. O sangue foi coletado por punção ocular 2, 4 e 6 horas após o tratamento com óleo de oliva. Dosagem de triglicérides (Synermed TM kits doados) e lipase foram feitas utilizando kits comerciais disponíveis que funcionam através de métodos colorimétricos e enzimáticos. O tratamento agudo com o extrato bruto metanólico de *C. sylvestris* (MCE) causou efeitos inibitórios tanto na elevação dos níveis séricos de triglicérides quanto na lipase sérica após administração de óleo de oliva.

Tavares et al. (2008) investigaram a susceptibilidade *in vitro* de bactérias patogênicas orais e fungos frente a extratos de *C. sylvestris*. Os micro-organismos utilizados neste estudo foram: *Streptococcus mutans* (ATCC 70069), *Tannerella forsythia* (ATCC 700191), *Staphylococcus aureus* (ATCC 12692), *Porphyromonas gingivalis* (ATCC 33277), *Fusobacterium nucleatum* (ATCC 31647), *Actinobacillus actinomycetemcomitans* (ATCC 33384), *Lactobacillus casei* (ATCC 14435), *Candida albicans* (ATCC 18804), *C. tropicalis* (ATCC 750), *C. dubliniensis* (ATCC MYA-179). Várias diluições foram feitas do extrato, como descrito: 0,0625; 0,125; 0,25; 0,5; 0,7; 0,8; 0,9, 1 µg/mL. Cada teste antimicrobiano também incluiu placas contendo o meio de cultura mais etanol como controle de solvente. Tetraciclina e nistatina foram utilizadas como controles positivos. A atividade antifúngica contendo 1/64- 1/8000 diluições, contra *Candida* spp. foi estimada em meio RPMI 1640 com L-glutamina e vermelho fenol e sem bicarbonato de sódio. Os resultados demonstraram sensibilidade de todos os microorganismos estudados. Este trabalho sugere o potencial uso do extrato etanólico de *C. sylvestris* como uma forma de tratamento alternativo de condições infecciosas da cavidade bucal, como estomatite protética, periodontite e cárie dentária.

Weckwerth et al. (2008) objetivaram comparar o poder antimicrobiano da *C. sylvestris* Sw (na forma de extrato com diferentes solventes: propilenoglicol, álcool de cereais e álcooletílico), em relação à clorexidina e aos antibióticos de uso clínico odontológico. Para o desenvolvimento deste trabalho, foram avaliadas 50 cepas de *E. faecalis* isoladas da cavidade oral de pacientes. Após o período de incubação as placas foram analisadas para a presença de colônias de *E. faecalis*. Assim, colônias com características de isolamento próprias de *Enterococcus* sobre a superfície do M-Enterococcus ágar, foram submetidas aos seguintes testes bioquímicos: produção de catalase, hidrólise da esculina, tolerância ao cloreto de sódio a 6,5%, fermentação do manitol, fermentação da arabinose, fermentação do sorbitol, desaminação da arginina, verificação da motilidade e produção de pigmento. Assim, a amoxicilina apresentou 100% de eficácia frente a linhagens de *E. faecalis* isoladas da cavidade oral, já a penicilina foi o segundo antibiótico com maior eficiência sobre as estirpes com 90% de linhagens sensíveis. Noventa e quatro por cento das estirpes de *E. faecalis* isolados da cavidade oral apresentaram resistência frente a clindamicina, enquanto que frente a clorexidina, 100% das estirpes de *E. faecalis* isolados da cavidade oral, mostram-se sensíveis. Dentre os extratos de *C. sylvestris* empregados, o de propilenoglicol apresentou maior atividade sobre as linhagens de *E. faecalis* isoladas da cavidade oral.

Duarte et al. (2009) avaliaram o pH e a liberação de íons de cálcio em pastas de hidróxido de cálcio associada com diferentes substâncias (clorexidina 1% em solução e clorexidina 2% gel, extrato de *C. sylvestris* SW e propilenoglicol (controle)). Para isso, 40 dentes de acrílico foram distribuídos em 4 grupos. Os dentes com a pasta (com suas devidas associações) e o acesso coronal selado foram imersos em 10 ml de água deionizada. Após 10 minutos, 24 horas, 48 horas e 7, 15 e 30 dias, os dentes foram removidos para outro recipiente e o líquido onde estavam armazenados os dentes foi analisado por espectrometria de absorção atômica e a leitura de pH foi feita com um medidor de pH. Os autores concluíram que todas as pastas se comportaram similarmente em termos de pH e liberação de cálcio no período estudado.

Guil-Guerrero e Campa (2009) avaliaram *in vitro* os extratos de 19 espécies de folhas em diferentes concentrações para o potencial citotóxico contra três linhas de células tumorais: HT29 (cólon), A549 (pulmão) e MDA-MB-231 (mama). Como ensaio de citotoxicidade utilizou-se o ensaio com MTT (tetrazólio azul) colorimétrico. Com isso, os autores concluíram que os extratos de nove espécies causaram menos do que 30% de crescimento em pelo menos uma linha de células. A partir destas espécies, alta atividade citotóxica foi detectada em extratos de *C. sylvestris* var. *língua* e *Ledotamnus sessiliflorus*; média atividade

foi encontrada em *Cyathea sp.* Duas outras espécies, *Cyrilla racemiflora* e *Heliamphora minor* demonstraram citotoxicidade menor, mas significativa.

De Mesquita et al. (2009) investigaram o potencial citotóxico de 412 extratos de plantas do cerrado brasileiro usadas na medicina tradicional pertencentes a 21 famílias contra linhagens de células tumorais. Para isso, os autores realizaram maceração de 50 espécies de planta o que resultou em 412 extratos hexânicos, diclorometânicos, etanólicos e hidroalcoólico. A citotoxicidade do extrato foi testada em carcinoma de colon humano (HCT-8), melanoma (MDA-MB-435), e linhagens tumorais do cérebro (SF-295), usando o teste azul de tiazolilo (MTT), também foi sendo realizado o fracionamento biomonitorado. Assim, verificou-se que 14 extratos de 13 espécies mostraram toxicidade em todas as linhagens tumorais testadas, com valores de IC₅₀ variando de 0,1 a 19.1 µg/mL. A atividade citotóxica mais significativa foi detectada para o extrato hexânico da casca do caule de *C. sylvestris* var. *lingua*, com um IC₅₀ de 0.1 µg/mL da linhagem HCT-8, 0.9 µg/mL para SF-295, 1.2 µg/mL para MDA-MB-435, e 1.3 µg/mL para HL-60, e para casca da raiz *Simarouba versicolor*, com IC₅₀ de 0.5 µg/mL para HCT-8, 0.7 µg/mL para SF-295, 1.5 µg/mL para MDA-MB-435, 1.1 µg/mL para HL-60. O fracionamento biomonitorado do extrato anterior levou ao isolamento de glaucarubinona, que mostrou atividade pronunciada contra as quatro linhagens celulares avaliadas.

Wang et al. (2009) descreveram o isolamento de dois novos diterpenos clerodânicos altamente oxigenados, casearinas U (1) e V (2), e dois novos glucosídeos ent-cauranos, sylvestrisidas A (3) e B (4), a partir de folhas de *C. sylvestris*, juntamente com 13 compostos já conhecidos, bem como avaliaram a citotoxicidade destes compostos sob diferentes células cancerosas e não-cancerosas. Suas estruturas foram estabelecidas com base em análises espectroscópicas de ressonância magnética nuclear 1D e 2D e comparadas com os dados da literatura. A citotoxicidade foi determinada contra um painel de células de mamíferos, incluindo 4 linhagens de células de câncer humano, ou seja, células de melanoma maligno (SK-MEL), de carcinoma de boca (KB), de carcinoma ductal de mama (BT549) e de carcinoma de ovário (SK-OV3), bem como não-cancerosas de fibroblastos do rim de macaco verde africano (células Vero) pelo ensaio de vermelho neutro. Nenhum dos compostos apresentou qualquer citotoxicidade até 10 µg/mL.

Werle et al. (2009) avaliaram a atividade do extrato aquoso e hidroalcoólico das folhas de *C. sylvestris* Swartz sobre os níveis séricos de triglicerídeos em ratos Wistar. Para este estudo os extratos foram preparados por maceração utilizando como líquido extrator água destilada e solução hidroalcoólica contendo etanol a 70%, para obtenção dos extratos, aquoso

e hidroalcoólico, respectivamente. Em seguida, os extratos foram filtrados, e concentrados em evaporador a vácuo e posteriormente suspensos em carboximetilcelulose 0,5% (CMC a 0,5%). Um grupo de animais recebeu via oral 500 mg/Kg de peso corporal da suspensão do extrato aquoso, e outro grupo, de suspensão de extrato hidroalcoólico. O grupo controle recebeu apenas CMS 0,5%. Após 24 horas da última administração foram coletadas amostras sanguíneas da aorta abdominal que foram analisadas para determinação dos níveis séricos de triglicerídeos. Os resultados demonstraram que o extrato hidroalcoólico de *C. sylvestris* Sw apresentou atividade hipotrigliceridemiante em ratos machos adultos da linhagem Wistar, o que pode justificar o seu uso popular na redução de peso.

Cavallari et al. (2010) avaliaram a relação entre 2 variedades de *C. sylvestris* encontradas na paisagem do sudeste brasileiro, onde tipos intermediários também são encontrados. No total, 376 indivíduos de 9 populações em 4 diferentes ecossistemas foram amostrados, e 9 microssatélites marcadores foram utilizados para avaliar os efeitos relativos dos ecossistemas e as variedades sobre a distribuição da diversidade genética entre as populações desta espécie. Os resultados apoiam o reconhecimento de duas variedades: *sylvestris* var. *sylvestris* e a *Casearia sylvestris* var. *língua*, bem como documenta a ocorrência de hibridização entre elas.

dos Santos et al. (2010) reportaram o isolamento de 5 casearinas (incluindo a nova casearina X) e de caseargrewiin F, a partir dos extratos etanólicos das folhas de *C. sylvestris*, e sobre a formação do produto de degradação de casearin X. As estruturas dos compostos foram determinadas a partir de dados de espectrometria e por comparação com a informação espectral disponível na literatura. As citotoxicidades destes compostos contra câncer humano e linhagens de células normais são também relatadas. Assim, os autores concluíram que um extrato etanólico das folhas de *Casearia sylvestris* proporcionou um novo diterpeno clerodânico, casearin X, juntamente com os compostos conhecidos casearinas B, D, L, e O, e X caseargrewiin F. Casearina degradada para o dialdeído correspondente, quando armazenado em clorofórmio deuterado. Os diterpenos isolados foram citotóxicos para linhagens de células de câncer humano, com F caseargrewiin sendo o constituinte mais ativo e o novo clerodânico, casearina X, o segundo composto ativo com valores de IC₅₀ comparáveis com o controle positivo doxorrubicina. Todos os diterpenos isolados apresentaram atividades mais baixas contra células humanas normais do que contra a linhagem celular cancerosa, o que pode indicar uma possível ação seletiva sobre as células cancerosas. O dialdeído Casearin X não foi citotóxico para as células cancerígenas, indicando que a ocorrência de grupos carboxílicos em C (18) e C (19) é incompatível com a atividade citotóxica.

Ferreira et al. (2010) determinaram o efeito citotóxico da casearinas L (Cas L), O (Cas O) e X (número CAS X) e (-)-ácido hardwickiico isolado a partir de folhas de *C. sylvestris*, e investigaram os mecanismos subjacentes envolvidos na morte celular *in vitro* induzida pela Cas X em células HL-60 de leucemia (0,7, 1,5 e 3,0 μ M). Neste experimento utilizou-se ensaios com MTT contra 3 linhagens de células leucêmicas: HL-60, K-562 e CEM. Outro ensaio utilizado foi o Alamar Blue com células mononucleares do sangue periférico humano (PBMC) após 72 horas de exposição à droga. Em seguida, avaliaram os mecanismos envolvidos na citotoxicidade das células leucêmicas. Concluíram então os autores, que Cas L, O e X apresentam efeito citotóxico significativo contra linhagens de células leucêmicas, enquanto o ácido hardwickiico é destituído de atividade. Isso é provavelmente devido à alta oxigenação presente nas casearinas e ausentes no ácido hardwickiico. Também apontam forte evidência de que Cas X exercem efeito citotóxico através da indução de apoptose, que enfatiza o potencial das casearinas como componentes promissores para a atividade antitumorais e como moléculas interessantes para novas drogas anticancerígenas.

Spandre (2010) avaliou a produção de óleo essencial de *C. sylvestris*, o autor realizou dois experimentos de extração e análise do óleo essencial a partir das folhas. O objetivo do primeiro experimento foi avaliar a influência da época de colheita no teor e composição do óleo essencial de folhas frescas de *C. sylvestris*. Houve variação sazonal na produção de óleo, sendo maio o mês que apresentou maior rendimento com 4,06 μ Lg-1 MS de óleo. Foram determinados 26 compostos, dos quais germacreno D, biciclogermacreno, trans-cariofileno, germacrene B e β -elemeno apresentaram teores superiores em relação aos demais constituintes. No segundo experimento objetivou-se avaliar a influência de três tipos de secagem no teor e composição do óleo essencial de folhas de *C. sylvestris*. A secagem em estufa a 60°C proporcionou maior quantidade de óleo essencial (10,22 μ Lg-1 MS). Foram determinados 32 compostos no óleo essencial dentre os quais o biciclogermacreno foi mais abundante em folhas secas a 40 e 60 °C e o δ -cadineno apresentou maior concentração em todos os tratamentos de secagem.

Ameni et al. (2011) estudaram, em ratos, os possíveis efeitos tóxicos da *C. sylvestris*. Para tal, foram realizados os testes de citotoxicidade com o objetivo de analisar o potencial tóxico das diferentes formas de extração da planta e, estudos pré-clínicos de toxicidade oral aguda, e em doses repetidas, por 28 e 90 dias, realizados de acordo com protocolos preconizados pelas agências reguladoras nacionais (Agência Nacional de Vigilância Sanitária - ANVISA) e internacionais (Organization for Economic Cooperation and Development - OECD) de avaliação de risco para substâncias químicas. Foram avaliados sinais sistêmicos de

toxicidade, ganho de peso e consumo de ração, hemograma completo, avaliação bioquímica (AST, ALT, GGT, ALP, uréia, creatinina, ácido úrico, colesterol, triglicerídeos, glicose, albumina, proteínas totais e cloreto), análise macroscópica e histopatológica de órgãos e avaliação do peso relativo dos órgãos linfóides baço e timo, e células do baço e medula óssea para averiguar os possíveis efeitos imunotóxicos. Além disso, foi obtido o perfil cromatográfico (*fingerprint*) utilizando a técnica analítica CLAE/UV. Os resultados mostraram que o EF de *C. sylvestris* não causou efeitos tóxicos quando administrado em dose única 2000mg/kg no estudo de toxicidade aguda, assim como também não mostrou efeitos sistêmicos de toxicidade ou efeitos imunotóxicos nos estudos em doses repetidas por 28 e 90 dias. Portanto, o autor sugere que o EF da *C. sylvestris* é seguro quando utilizado mesmo prolongadamente.

Prieto et al. (2012) avaliaram se o extrato e a casearina X (um diterpeno clerodânico de *C. sylvestris*) são protetores contra os efeitos nocivos dos poluentes atmosféricos provenientes da queima da cana de açúcar. Para verificar o efeito, foi utilizado o teste de micronúcleo *Tradescantia* em células de pólen meióticas de *Tradescantia pallida*, o teste de micronúcleos em células de medula óssea de camundongos, e o ensaio cometa em células sanguíneas de ratos. Partículas totais suspensas (TSP) de ar foram utilizadas como composto mutagênico. Para o teste de micronúcleo *Tradescantia*, cortes de *T. pallida* foram tratados com o extrato em 0,13, 0,25, ou 0,50 mg/ml. Para ambos os ensaios os camundongos foram tratados durante 15 dias com o extrato- 3,9, 7,5, ou 15,0 mg/kg de peso corporal (PC) ou com casearin X- 0,3, 0,25, ou 1,2 mg/kg de peso corporal, após o qual eles receberam TSP (3,75 mg/kg de peso corporal). Os autores concluíram, que o extrato etanólico da *C. sylvestris* e a casearina X protegem o DNA de danos induzidos por poluentes atmosféricos provenientes da queima da cana de açúcar.

Albano et al. (2013) investigaram as propriedades anti-inflamatórias e antioxidantes do extrato bruto hidroalcoólico (HCE) tomado a partir da *C. sylvestris* sw. (*Salicaceae*). Assim, o efeito do HCE da planta (3-300mg/kg) na redução da resposta inflamatória a carragenina foi investigada em pleurite de ratos (intrapleural, 2% em 0,2 ml), ou em edema da pata de ratos (intraplantar, 300µg/20µL, pata traseira direita). A planta de ação anti-inflamatória foi avaliada pela sua capacidade de inibir a migração celular, a atividade enzimática da mieloperoxidase (MPO) e a produção de nitrito / nitrato ou edema. A atividade antioxidante *in vitro* do extrato contra a peroxidação lipídica e danos às proteínas foi avaliada como caminhos possíveis para contribuir como mecanismos anti-inflamatórios. Portanto, este estudo demonstrou que HCE das folhas da *C. sylvestris* sw apresenta ação anti-inflamatória

sistêmica, baseado em diferentes modelos de inflamação em animais ou ensaios bioquímicos *in vitro*.

Prieto et al. (2013) avaliaram o efeito quimiopreventivo do CASB usando o ensaio cometa (Electroforese em gel de célula única) que detecta danos/reparos no DNA, o teste de Ames e um ensaio anti-oxidante. A genotoxicidade e antigenotoxicidade foram avaliada pelo ensaio cometa em células HepG2. Foi realizado também o ensaio com MTT, para verificar a citotoxicidade. A mutagenicidade e a antimutagenicidade foram avaliadas pelo ensaio de Ames que utiliza a Salmonella. Além destes testes foi feito ensaio antioxidante. Assim, verificaram que o CASB foi genotóxico em concentrações superiores a 0,30µM quando incubadas com a enzima FPG (glicosilase formamidopyrimidine-DNA). Para o ensaio cometa de antigenotoxicidade, CASB protegeu o DNA de danos causados por H₂O₂ na linha de células HepG2, em concentrações superiores a 0,04 µM com um pós-tratamento, e acima de 0,08µM com pré-tratamento. CASB não foi mutagênico (Teste de Ames) frente a Salmonella TA 98 e TA 102. Nos ensaios de antimutagenicidade, o composto é um forte inibidor contra a aflatoxina B1 (AFB) no TA 98 (> 88,8%), ao passo que é moderado (42,7-59,4%) inibidor da mitomicina C (MMC) no TA 102. Além disso, no ensaio antioxidante usando DCFDA, CASB reduziu espécies reativas de oxigênio (ROS) geradas por H₂O₂. Assim, CASB mostraram interessantes características quimiopreventivas em ambas as células HepG2 e *S. typhimurium*, protegendo o DNA contra diferentes tipos de danos e agindo como um antioxidante.

2.2 Citotoxicidade de enxaguatórios bucais disponíveis no mercado

Mariotti e Rumpf (1999) investigaram o efeito da clorexidina na proliferação de fibroblastos para determinar a concentração inibitória necessária para reduzir a proliferação celular para 50% (ID₅₀) e, investigaram também, se doses de clorexidina que não tem efeito na proliferação celular podem mediar a produção de proteína colágena e não-colágena. Os autores incubaram fibroblastos gengivais humanos em meio essencial de Eagle (MEM) contendo clorexidina em concentrações que variaram de 1 µM a 1300 µM a 37°C durante 1, 5 ou 15 minutos. As células do grupo controle receberam um volume igual de MEM sem clorexidina para tempos semelhantes. Em todas as amostras, a proliferação celular foi dependente da concentração de clorexidina solubilizada em cultura de células, mas independente da duração da exposição à clorexidina. A média da concentração inibitória

necessária para reduzir a proliferação celular para 50% (ID₅₀) foi de 222,1 µM. No que diz respeito à produção de proteína colágena e não colágena, os fibroblastos expostos a concentrações de clorexidina (1µM) bem abaixo de ID₅₀ tiveram uma redução de 65% na produção de colagénio e uma redução de 57% na produção de proteína não-colágena. Assim, os autores concluíram que a clorexidina induziu uma redução dose-dependente na proliferação celular e que as concentrações de clorexidina que têm pouco efeito sobre a proliferação celular podem reduzir significativamente tanto a produção de proteínas colágenas quanto não-colágenas em fibroblastos gengivais humanos *in vitro*. Ressaltaram também que a introdução de concentrações comercialmente disponíveis (0,12%) ou concentrações comerciais diluídas (tão baixo quanto 0,00009%) de clorexidina em locais cirúrgicos por curtos períodos de tempo antes do fechamento da ferida pode ter graves efeitos tóxicos sobre fibroblastos gengivais e afetando negativamente a cura da ferida.

Zhang et al. (2003), testaram a citotoxicidade do MTAD comparado com os irrigantes e medicamentos normalmente utilizados como irrigantes intra-canal. Os materiais utilizados para comparação foram: eugenol, 3% de peróxido de hidrogênio, NaOCl (5,25%, 2,63%, 1,31% e 0,66%), irrigante aquoso REDTA, Peridex (gluconato de clorexidina 0,12%), pasta pulpdent (Ca(OH)₂) e MTAD (doxiciclina, ácido cítrico e Tween 80). Para o teste de citotoxicidade foi utilizado células L929 em ensaio com MTT. Com isso, os autores encontraram que o MTAD é menos citotóxico que o eugenol, 3% H₂O₂, pasta de Ca (OH)₂, 5,25% NaOCl, Peridex e EDTA e mais citotóxico que as demais concentrações de NaOCl.

Erdemir, Sengün e Ulker (2007) determinaram a citotoxicidade de 3 anti-sépticos comerciais Klorhex (clorexidina 0,12%), Andorex (Benzidamina HCl 0,15% e clorexidina 0,12%) e Tanflex (Benzidamina HCl 0,15%) em células epiteliais bucais, utilizando teste de micronúcleos (MN). 28 pacientes com idade entre 16 e 24 anos submetidos aos 3 bochechos foram analisados antes e após uma semana de exposição. Salina fisiológica foi utilizada para o grupo controle. A incidência de MN foi marcada no epitélio bucal de cada um dos participantes. A diferença entre pré-e pós-tratamento na incidência de MN, na incidência de placa (PI) e nos índices gengivais (GI) após uma semana, foi comparada por testes estatísticos não-paramétricos. A incidência de MN aumentou em grupos Klorhex, Tanflex e Andorex após as exposições, mas quando comparado com o grupo controle, não houve nenhuma diferença entre Andorex e o grupo controle. Nos outros grupos estudados, a incidência de MN foi significativamente aumentada após 7 dias de tratamento. Os valores de GI de todos os grupos foram significativamente menores e os valores de PI foram reduzidos apenas no grupo

Klorhex. Os autores concluíram que os resultados preliminares deste estudo, suportam a presença de possíveis efeitos citotóxicos de bochechos em células epiteliais gengivais.

Flemingson et al. (2008) examinaram o efeito de 3 enxaguatórios comerciais (Hexidine 0,2%, Listerine Cool Mint, Betadine 1%) sob cultura e proliferação de fibroblastos gengivais humanos. Os fibroblastos gengivais foram cultivados e incubados em meio de Eagle contendo clorexidina, listerine, iodopovidona nas concentrações (1%, 2%, 5%, 10%, 20% e 100% da solução dada) a 37°C por 1, 5 e 15 min. E o controle que apresentou igual volume e meio sem adição do enxaguatório, com os mesmos tempos. Em todos os grupos, a proliferação foi dependente da concentração do enxaguatório solubilizado na cultura de células, mas independente da duração para os 3 enxaguatórios. Os resultados mostraram que as 3 soluções foram tóxicas para os fibroblastos gengivais humanos, sendo a clorexidina a mais citotóxica. Verificou-se que as concentrações diluídas de Listerine (1% e 2% de determinadas soluções) foi mais citotóxica do que clorexidina e iodopovidona. Esses resultados sugerem que a Clorexidina, Listerine e iodopovidona são capazes de induzir uma redução dependente da dose na proliferação celular de fibroblastos.

Giannelli et al. (2008) investigaram a citotoxicidade *in vitro* de clorexidina em células que podem representar alvos comuns para sua ação nos procedimentos cirúrgicos no tratamento de periodontite e peri-implantite e elucidar seus mecanismos de ação. As linhas celulares de osteoblastos, células endoteliais e fibroblastos foram expostas a várias concentrações de clorexidina (CHX) para diferentes tempos e analisadas para a viabilidade celular e morte celular. Também a análise do potencial de membrana mitocondrial, mobilização intracelular de Ca^{2+} e geração de espécies reativas de oxigênio (ROS) foram feitas em paralelo, para correlacionar os danos celulares induzido por CHX com alterações nos parâmetros-chave da homeostase celular. Assim, o CHX afetou a viabilidade celular em dose e tempo-dependente, especialmente em osteoblastos. O seu efeito tóxico consistiu na indução de morte celular por apoptose e autofágica/necrótica e perturbação da função mitocondrial envolvida, aumento de Ca^{2+} intracelular e stress oxidativo. Estes dados sugerem que a CHX é altamente citotóxica *in vitro* e sugere uma utilização mais advertida do anti-séptico nas cirurgias orais.

Faria et al. (2009) testaram a hipótese de que a clorexidina pode induzir a morte celular em cultura de fibroblastos L929 via estresse do retículo endoplasmático (ER). Essa hipótese foi testada por meio de luz e microscopia eletrônica, quantificação de apoptose e necrose por citometria de fluxo e avaliação da expressão da proteína 78 reguladora de glicose 78-kDa (Grp78), um marcador de ativação da resposta da proteína desdobrada (UPR) em

cultura de fibroblastos L929. Neste estudo, a microscopia eletrônica de transmissão revelou que o tratamento de células L929 com clorexidina causa morte celular por apoptose e necrose. A CHX causa ambas as mortes celulares simultaneamente, a prevalência da apoptose ou necrose depende da intensidade do estímulo incitador, assim a morte celular de L929 ocorre por apoptose em menor concentração e por necrose em maior concentração. Os autores concluíram que a CHX causa morte celular ou por necrose ou por apoptose via estresse ER.

Rajabalian, Mohammadi e Mozaffari (2009) estudaram os efeitos citotóxicos dos enxaguatórios pérsica e clorexidina (CHX) sobre linhagens de culturas de células de rato e humana. Este estudo experimental verificou os efeitos tóxicos de quatro 4 dos colutórios pérsica e CHX sobre KB (linhagem de carcinoma bucal), Saos-2 (células de odontoplastoma), J744 A1 (macrófagos de camundongo), e as células de fibroblastos gengivais por meio do ensaio com MTT [brometo de 3 - (4,5-dimetiltiazol-2-il) -2,5-difenil tetrazólio brometo]. O efeito dos componentes de soro fetal bovino (SFB) na citotoxicidade destes colutórios também foi investigado. Os resultados indicaram que, o enxaguatório pérsica em concentrações superiores a 0,1%, exerce um efeito citotóxico significativo sobre todas as linhagens de células. CHX, a uma concentração de 0,001%, exerceu efeitos tóxicos somente em fibroblastos gengivais; concentrações superiores a 0,001% foram necessários para produzir a morte celular significativa nas outras linhas de células. Em todas as doses estudadas, tanto pérsica quanto a CHX exerceram significativamente maiores efeitos citotóxicos na ausência de SFB do que na sua presença (ou seja, em meio de cultura controle). As toxicidades dos 2 bochechos foram atenuadas na presença de SFB (10%). Os autores concluíram que os resultados indicam que tanto o enxaguatório pérsica quanto a CHX são tóxicos para os macrófagos, células epiteliais, fibroblastos, osteoblastos e células de uma forma dependente da concentração.

Santos et al. (2009) avaliaram a citotoxicidade de um enxaguatório bucal em 6 períodos de tempo diferentes. Para isso os autores avaliaram o potencial citotóxico do enxaguatório bucal Cepacol tradicional nos tempos: 1, 15, 30, 45, 60 e 120 segundos sobre fibroblastos gengivais L929. Utilizou-se 3 grupos controle: positivo - detergente celular Tween 80, negativo - PBS, e controle de célula - células não expostas a nenhum tratamento. O ensaio de citotoxicidade foi realizado utilizando cultura celular de fibroblasto L929. Após contato do enxaguatório com as células, as mesmas foram colocadas em contato com o corante vermelho neutro. Os resultados demonstraram que o enxaguatório apresentou citotoxicidade em todos os tempos avaliados. Essa citotoxicidade foi diretamente proporcional ao tempo de exposição à cultura de células. Houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos controle de

células e o grupo do Cepacol em todos os tempos avaliados. Com os dados obtidos, os autores concluíram que o enxaguatório Cepacol tradicional foi citotóxico em todos os períodos de tempo avaliados.

Lessa et al. (2010) avaliaram os efeitos citotóxicos de diferentes concentrações de clorexidina sobre células de cultura odontoblásticas (MDPC-23), depois de diferentes tempos de exposição. Para essa avaliação, as células foram cultivadas e expostas a soluções de CHX, em concentrações de 0,06%, 0,12%, 0,2%, 1% e 2%. Meio de cultura puro (alfa-MEM) e 3% de peróxido de hidrogênio foram utilizados como controle negativo e positivo, respectivamente. Depois de expor as culturas de células às soluções controles e CHX durante 60 segundos, 2 horas ou 60 segundos com um período de recuperação de 24 horas, o metabolismo da célula (ensaio com MTT), e a concentração de proteína total foram avaliados. A morfologia celular foi avaliada por microscopia eletrônica de varredura. Assim os autores concluíram que a CHX tiveram um apresentou efeito tóxico dose-dependente sobre as células MDPC-23.

Pithon et al. (2011) avaliaram a hipótese de que enxaguatórios bucais sem álcool apresentam menor citotoxicidade quando comparado aos com álcool. Para o desenvolvimento da pesquisa, os autores avaliaram os enxaguatórios: Plax com e sem álcool, nos seguintes tempos: 1, 15, 30, 45, 60 e 120 segundos quanto ao seu efeito citotóxico em fibroblastos L929. Utilizaram-se 3 grupos controle: positivo - detergente celular Tween 80, negativo - PBS, e controle de célula (CC) em que as células não foram expostas a nenhum material. O ensaio de citotoxicidade foi realizado utilizando cultura celular de fibroblasto L929, com revelador vermelho neutro. O enxaguatório sem álcool apresentou maior quantidade de células viáveis do que o com álcool, no entanto ainda assim apresentaram maior toxicidade do que o controle de células e o controle negativo. A citotoxicidade foi diretamente proporcional ao tempo de exposição às culturas de células. Dessa forma os autores concluem que os enxaguatórios sem álcool apresentaram menor citotoxicidade que os com álcool, mas ainda apresentaram citotoxicidade quando comparado aos grupos controle de célula e negativo.

2.3 Atividade antimicrobiana de enxaguatórios bucais disponíveis no mercado

Zanela et al. (2002) determinaram a eficácia, aceitação e possíveis efeitos colaterais de agentes antimicrobianos em crianças. Os autores avaliaram em um total de 200 crianças o

efeito de bochechos diários com solução placebo de água deionizada mentolada; gluconato de clorexidina 0,12% associado ao fluoreto de sódio 0,05%; digluconato de clorexidina 0,2% e esteviosídeo 0,5% associado ao fluoreto de sódio 0,05% pH 3,4, sobre o acúmulo de placa dentária e o nível de *S. mutans* salivares. O acúmulo de placa dentária foi avaliado no início e no final do experimento, enquanto os níveis de *S. mutans* foram quantificados com o Caritest SM em 3 momentos: antes do primeiro bochecho, 24 horas após o primeiro bochecho e 1 semana após o último bochecho. O regime de bochechos foi diário, com 5 ml de solução, por 1 minuto, durante 4 semanas. Soluções de clorexidina, associada ou não a flúor, reduziram significativamente a formação da placa dental, mas não reduziram os níveis de *S. mutans*. Ambas as soluções produziram pigmentação dental suave e alterações no gosto de algumas das crianças, embora não tenham sido observados outros efeitos colaterais, por isso, eles podem ser recomendados pelo odontopediatra como auxiliar na redução de placa, em situações específicas. A associação de esteviosídeo 0,5% e fluoreto de sódio 0,05% não apresentou resultados satisfatórios.

Herrera et al. (2003) avaliaram *in vitro* e *in vivo* a atividade antimicrobiana de quatro enxaguatórios comercialmente disponíveis de clorexidina 0,12% (CHX): CHX 0,12% + álcool 5%; CHX 0,12% + CPC (cloreto de cetilpiridínio) - sem álcool; CHX 0,12% + NaF - sem álcool; CHX 0,12% - sem álcool. O ensaio de atividade antimicrobiana *in vitro* consistiu em um teste de contato modificado, onde 20 espécies bacterianas selecionadas foram testadas durante 1 min com cada produto teste. Após o contato, o inóculo foi cultivado, e os resultados foram expressos em termos de sobrevivência / resistência, e a porcentagem de sobrevivência em relação a um controle de solução salina. O ensaio *in vivo*, consistiu de um estudo randomizado, cruzado, duplo-cego, de contagem bacteriana salivar. 10 voluntários bochecharam durante 1 min, com cada um dos produtos testados. Amostras salivares foram obtidas antes do bochecho, e depois de 5 minutos, 1, 3, 5 e 7 horas. As porcentagens de sobrevivência, em relação à condição inicial, foram calculadas para cada tempo. Assim, diferenças importantes na atividade, entre produtos CHX 0,12%, foram detectadas por ambos testes *in vitro* e *in vivo*. A formulação com o álcool foi mais ativa do que aquelas sem álcool, com exceção da formulação com CHX + CPC, em que a reformulação e adição de CPC não só compensou, mas sim aumentou a atividade antimicrobiana.

De Albuquerque et al. (2004) estudaram o efeito de um bochecho de 30 segundos com clorexidina 0,12% (Periogard) na redução do número de *S. Aureus* e *S. Mutans* viáveis na saliva de pacientes e, determinaram as diluições inibitórias máximas (MID) deste antisséptico e da solução de cloreto de cetilpiridínio 0,05% (Cepacol) afim de comparação. Para a

realização do experimento, amostras de saliva foram coletadas de 60 pacientes antes e depois do bochecho por 30 segundos com clorexidina e cultivadas em meios adequados. O número de micro-organismos foi calculado com base nas unidades formadoras de colônias (UFCs). Para a determinação *in vitro* do MID, 25 linhagens de *S. aureus* foram semeadas em meios contendo uma das diluições sequenciais de ambos os antissépticos. Assim, as cepas de *S. aureus*, *Streptococcus mutans* e *Streptococcus sobrinus* foram isoladas inicialmente a partir de 45%, 63% e 28% dos pacientes, respectivamente. Após o bochecho com clorexidina, a redução do número de UFC foi acima de 99% para todos os microrganismos estudados. Na determinação do MID, todos os isolados foram inibidos com diluições de 1/20 e 1/80 de cetilpiridínio e clorexidina, respectivamente. Pode-se concluir que bochecho com clorexidina em pré-procedimento simples é efetivo na redução de micro-organismos salivares para níveis atualmente considerados seguros para realizar procedimentos invasivos.

Otten et al. (2010) determinaram a contribuição da placa e da saliva na substantividade, de três bochechos antimicrobianos (Listerine, Meridol, Crest Pro Health), utilizados em combinação com um creme dental (Coolmint Prodent). Voluntários escovaram os dentes por 4 semanas, sem a utilização de antimicrobianos e durante as 2 últimas semanas, metade dos voluntários passaram a utilizar um antimicrobiano além da escovação. No final do período experimental, 6 horas após a higiene oral, a placa e a saliva foram coletados, e a concentração bacteriana e a viabilidade foram determinados. A contribuição da placa e da saliva para a substantividade foi avaliada através da combinação: placa obtida após a limpeza mecânica apenas, com a placa e a saliva obtidas após utilização adicional de um agente antimicrobiano. Posteriormente, a resultante da viabilidade e do combinado de placas foi determinada. A viabilidade da amostra da placa após lavagem adicional com bochechos foram inferiores aos da placa obtida após a limpeza mecânica única, independentemente do enxaguatório envolvido. Além disso, a placa recolhida 6 horas após o bochecho com antimicrobiano continha um excesso da atividade antimicrobiana. Apenas Listerine mostrou diminuição da viabilidade na saliva, mas nenhum dos enxaguatórios mostrou qualquer atividade antimicrobiana residual na saliva. Os resultados indicam que a placa deixada para trás após a limpeza mecânica contribui com a substantividade antimicrobiana prolongada de antissépticos.

Prasanth (2011) estudou *in vitro* a eficácia antimicrobiana de diferentes cremes dentais e enxaguatórios, contra patógenos orais. Cinco cremes dentais e cinco enxaguatórios bucais foram testados quanto à atividade antimicrobiana contra 3 patógenos orais (*S. mutans* (MTCC 890), *Escherichia coli* (MTCC 579) e *Candida albicans* (MTCC 854)) através do teste de

difusão em ágar. Assim, os autores concluíram que as formulações de dentífricos que contêm triclosan são mais eficazes no controle da microflora oral, em comparação com os dentífricos sintéticos não contendo triclosan. Entre as formulações de enxaguatórios a clorexidina foi a mais eficaz ou tão eficaz quanto o triclosan contra os organismos testados.

Wikén Albertsson, Persson e van Dijken, 2013 avaliaram o efeito de bochechos com óleos essenciais e com clorexidina sem álcool sobre *S. mutans* e lactobacilos na saliva. Vinte voluntários participaram do estudo cross-over randomizado, duplo-cego. Três enxaguatórios foram usados em um período de 16 dias de enxague bucal, além da regular higiene oral mecânica: uma solução com óleos essenciais (OE; Listerine), uma solução de clorexidina livre de álcool (CHX; Paroex) e água (controle negativo). Nos dias 0 (baseline) e 17 (final) de cada período de bochecho, foi coletada saliva por meio de estímulo com parafina a fim de analisar UFC/ml de saliva de *S. mutans* e *Lactobacilos sp.* Com isso, os autores concluíram que houve uma redução significativa na quantidade de bactérias cariogênicas na saliva após 16 dias de bochecho com clorexidina sem álcool, mas não depois dos bochechos com óleos essenciais.

2.4 Ação dos enxaguatórios bucais disponíveis no mercado sobre as propriedades dos materiais restauradores odontológicos

Lee et al. (2000) avaliaram a estabilidade de cor de materiais restauradores estéticos (compômeros e resinas compostas) depois da imersão em enxaguatórios bucais (Listerine, Peridex, Rembrandt Age Defying) e envelhecimento artificial acelerado (EAA), através do espectrofotômetro (Color-Eye 7000) de acordo com o sistema CIE $L^*a^*b^*$. Os autores verificaram que depois de 7 dias de imersão os espécimes submetidos aos enxaguatórios bucais não tiveram um aumento significativo na cor comparado à água destilada, exceto para alguns casos de Tetric-Ceram. Após 7 dias de imersão e EAA, o grupo submetido a enxaguatórios bucais também não mostrou aumento significativo na mudança de cor quando comparado a água destilada. O EAA produziu alteração de cor (ΔE^*) de 1,1-3,9, que foi influenciado principalmente pelo material. Com algumas exceções a alteração de cor de compômeros e resina composta após imersões em enxaguatórios bucais não foram perceptíveis, ou seja, $\Delta E^* < 3,3$.

Claydon et al. (2001) estudaram *in vivo* o efeito da associação de clorexidina a polivinilpirrolidona (PVP) na redução da placa e no manchamento causado pela dieta. Para

avaliar a placa bacteriana e o manchamento utilizaram-se de estudo duplo-cego randomizado, cross-over, envolvendo indivíduos saudáveis com um alto padrão de higiene oral e saúde gengival. As formulações dos enxaguatórios neste estudo foram: (A) álcool aquoso (controle placebo), (B) clorexidina 0,03%, (C) clorexidina 0,06%, (D) clorexidina 0,06% + 1,2% PVP, (E) clorexidina 0,06% + 5% PVP, (F) Clorexidina 0,06% + 10% PVP. Com isso, os autores concluíram que PVP, nas concentrações testadas, reduziram a propensão à manchas da clorexidina 0,06%, mas à custa de certa perda da inibição da placa.

Gürdal et al. (2002) propuseram neste estudo examinar o efeito de 3 enxaguatórios testes em diferentes materiais restauradores estéticos. Enxaguatórios são usados como grupo de tratamento, enquanto a água destilada serviu como grupo controle. 72 espécimes foram confeccionados, sendo 24 de cada material restaurador (Brilliant dentin, Compoglass F e Chelon-Fil). As amostras foram estocadas em 20 mL de um dos enxaguatórios por 12 horas. Utilizou-se para as medidas de cor e microdureza dos materiais testados a microdureza Vickers e um espectrofotômetro. Os autores não observaram interações significativas entre as soluções teste e os materiais testados em relação à dureza, e a cor dos materiais. Efeitos de antissépticos em materiais restauradores pode variar, dependendo de muitos fatores *in vivo*, que não poderiam ser replicados *in vitro*. Assim, os autores recomendaram a avaliação de rotina dos efeitos de antissépticos em materiais restauradores estéticos.

Sadaghiani, Wilson e Wilson (2007a) investigaram o efeito de quatro enxaguatórios comercialmente disponíveis (Plax, Macleans, Listerine, Corsodyl ou água deionizada como controle) sobre a rugosidade superficial de ionômeros de vidro modificados por resina (Vitremer, Compoglass e Dyract), quando utilizado com e sem escovação dental. A rugosidade superficial foi avaliada por microscopia eletrônica de varredura (MEV) e perfilometria (Perthen S8P profilometer unit). Os autores concluíram que as exposições dos materiais analisados aos enxaguatórios bucais aumentam a rugosidade superficial, e que os efeitos adversos foram mais acentuados quando associado com escovação.

Sadaghiani, Wilson e Wilson (2007b) investigaram os possíveis efeitos de 3 enxaguatórios bucais na dureza superficial e peso de um ionômero de vidro modificado por resina (Vitremer) e 2 compômeros (Compoglass e Dyract) quando utilizados com e sem escovação. Metade dos espécimes foi exposta a apenas um dos enxaguatórios estudados (Plax, Macleans, Listerine, Corsodyl ou água desionizada) e o restante a um dos enxaguatórios e a escovação. A dureza superficial inicial e a dureza superficial, após 24 semanas, foram avaliadas utilizando um instrumento de teste de dureza de Wallace. Também foram avaliadas, possíveis alterações de peso inicial e após 24 semanas, utilizando uma balança digital. Assim,

os autores verificaram que a dureza superficial aumentou em todos os grupos submetidos apenas a escovação, enquanto não apresentou diferença significativa entre os grupos submetidos à escovação associada ao enxaguatório. Para os espécimes de Vitremer após 24 semanas de exposição aos antissépticos bucais e escovação, verificou-se que alguns grupos perderam peso, enquanto outros apresentaram um aumento de peso. Para Compoglass e Dyract, todos os grupos tinham perdido peso após 24 semanas. Os autores concluíram que a exposição dos materiais investigados neste estudo aos antissépticos bucais e a escovação proporcionou efeitos adversos sobre a dureza superficial, sendo esses efeitos mais aparentes quando os enxaguatórios foram utilizados sozinhos.

Godoi (2009) avaliou *in situ* a influência de fatores da dieta associado ao uso de clorexidina na cor e na rugosidade superficial de diferentes resinas compostas (Z250 e Filtek Supreme). Foram confeccionados 112 espécimes. O estudo foi constituído por duas fases de 5 dias cada, com um período de *washout* de 9 dias entre elas. Os espécimes de cada um dos materiais foram divididos entre 14 voluntários para a realização dos bochechos e ingestão do chá em cada uma das fases do experimento. Metade dos voluntários utilizou, na primeira fase do experimento, clorexidina 0,12% e a outra metade placebo. Todos os voluntários, após o bochecho com clorexidina 0,12% ou placebo ingeriram 200 mL de chá em ambas as fases. Na segunda fase do experimento, os espécimes foram substituídos por outros e os voluntários foram cruzados quanto à solução, de modo que todos usaram ambas às soluções. As leituras de cor e rugosidade superficial foram obtidas antes da fixação do espécime no aparelho intra-bucal e após 24 horas do término do período experimental. Assim, o autor conclui que: houve uma maior alteração de cor da resina composta quando se utiliza soluções a base de clorexidina 0,12% associada ao chá preto e a utilização de clorexidina durante 5 dias não influenciou na rugosidade superficial dos materiais estudados e; o tempo teve influência sobre o aumento da rugosidade superficial.

Godoi et al. (2011) avaliaram *in vitro* a alteração de cor de resinas compostas (Filtek Supreme e Charisma), quando da associação de clorexidina a fatores da dieta a base da proteína *Glycine Max*, por meio do Colorímetro espectrofotométrico (Color Guide 45/0, PCB 6807 BYK – GARDNER). Os autores concluíram que a maior alteração de cor ocorreu aos 28 dias e foi determinada pela associação de suco de uva sem *Glycine Max* e clorexidina para ambas as resinas. Verificaram também que a resina composta Charisma apresentou maior alteração de cor que a resina Filtek Supreme quando analisada isoladamente.

Miranda et al. (2011) objetivaram *in vitro* avaliar o efeito de diferentes enxaguatórios bucais na rugosidade superficial e microdureza Knoop de 2 diferentes resinas compostas. 80

espécimes foram preparados e divididos em 8 grupos (n=10) de acordo com a resina composta, e soluções de imersão (G1- água destilada, 4 Seasons; G2 – Colgate plax Overnight, 4 Seasons; G3- Colgate plax sem álcool, 4 Seasons; e G4- Colgate plax whitening, 4 Seasons; G5- água destilada, Exthet X; G6 – Colgate plax Overnight, Exthet X; G7- Colgate plax sem álcool, Exthet X; e G8- Colgate plax whitening, Exthet X). As leituras iniciais foram realizadas e depois os espécimes foram imersos em 2 mL de enxaguatório por 12 horas, após a qual foi realizada a segunda leitura. Após 24 horas foi realizada a terceira leitura. Independentemente do tipo de solução e do tempo de exposição, não houve diferença estatisticamente significativa para a rugosidade superficial entre as resinas; a solução Colgate Plax whitening proporcionou maior rugosidade superficial para ambas as resinas compostas depois de 12 e 24 horas de imersão. Para a análise de microdureza Knoop, houve uma redução significativa para todos os grupos depois de 12 e 24 horas. Assim, os autores concluíram que os enxaguatórios que contêm peróxido de hidrogênio e/ou álcool diminuem a microdureza das resinas testadas; no entanto, enxaguatórios contendo peróxido de hidrogênio tem um alto efeito deletério na rugosidade superficial das resinas compostas estudadas.

Festuccia et al. (2012) propuseram avaliar o efeito de enxaguatórios bucais na estabilidade de cor, rugosidade superficial e microdureza de duas resinas compostas. Para isso, espécimes dos compósitos Filtek Z250 e Z350 foram fabricados. Cor, rugosidade superficial e microdureza superficial Knoop iniciais de cada espécime foram medidas e, em seguida, os mesmo foram imersos em 5 soluções de enxaguatórios bucais: água destilada, Plax classic, Plax sem álcool, Periogard e Listerine e as leituras finais realizadas. A mais significativa mudança de cor foi observada para Z250 quando imerso em Listerine. Z350 mostrou maior mudança de cor quando imerso em Plax sem álcool, mas sem diferença significativa para o Listerine. Em relação à rugosidade, ambos compósitos mostraram significativa mudança quando imerso em Listerine em comparação com Plax sem álcool. Mudança na microdureza de Z350 foi significativa quando o compósito foi imerso em Plax livre de álcool.

Soares et al. (2012) testaram a hipótese de que o uso de enxaguatórios, consumo de refrigerantes, bem como o tipo de luz utilizada para fotopolimerização pode mudar a rugosidade superficial e morfologia da resina composta nanoparticulada (Z350). 80 amostras foram divididas em 8 grupos sendo 4 para a luz halógena: G1 - saliva (controle), G2 – Pepsi Twist, G3 – Listerine, G4 – Colgate Plax; e 4 para a luz LED: G5 – saliva; G6- Pepsi Twist; G7- Listerine, G8- Colgate plax. Os valores de rugosidade superficial foram medidos no tempo inicial, e depois de 7 e 14 dias. Com essa metodologia, os autores puderam concluir

que todos os tratamentos resultam em mudanças na superfície da resina estudada, porém, a mudança mais significativa foi no grupo da Pepsi Twist. A imersão da resina nanoparticulada em enxaguatórios com álcool e refrigerantes aumenta a rugosidade superficial, bem como a polimerização com luz halógena associada com enxaguatórios contendo álcool resultam em significativa rugosidade superficial do compósito estudado.

Trauth et al. (2012) avaliaram a influencia de diferentes enxaguatórios bucais na rugosidade superficial de uma resina composta nanoparticulada depois da escovação. Cem espécimes de resina composta foram distribuídos aleatoriamente entre dois grupos: escovados e não escovados e, em seguida, subdividido em 5 subgrupos de acordo com a solução de bochecho: Colgate Plax Fresh Mint, Oral B, Cepacol, Colgate Plax, e saliva artificial (controle). As amostras foram imersas nos enxaguatórios por 1 minuto, 5 dias por semana, 2 vezes ao dia, por um período de 3 semanas. O grupo controle, não foi submetido a escovação e permaneceu imerso em saliva artificial. A escovação foi realizada uma vez por semana por 1 minuto, por 3 semanas. A rugosidade superficial foi medida após o período de imersão e escovação, por meio do rugosímetro SJ-201 P/M (Mitutoyo). Os autores concluíram que a rugosidade superficial da resina nanoparticulada estudada pode ser influenciada por enxaguatórios associados com escovação. Visto que, os espécimes escovados e submetidos ao Colgate Plax Fresh Mint produziu menos rugosidade superficial.

Proposição

3 PROPOSIÇÃO

Os objetivos deste trabalho foram:

- Obter o óleo essencial de *Casearia sylvestris* por Hidrodestilação;
- Determinar por meio da Cromatografia a gás acoplada à Espectrometria de massas os possíveis compostos presentes majoritariamente no óleo essencial de *Casearia sylvestris*.
- Verificar a efetividade antimicrobiana do óleo essencial puro e de formulação de enxaguatório bucal contendo óleo essencial de *Casearia sylvestris* frente a micro-organismos causadores da cárie dental (*Streptococcus mutans*, *Streptococcus mitis*, *Streptococcus sanguinis*, *Streptococcus salivarius* e *Enterococcus faecalis*) por meio da determinação dos valores de Concentração Inibitória Mínima (CIM) e Concentração Bactericida Mínima (CBM) pelo método de Microdiluição em caldo;
- Determinar através da análise da curva de morte o tempo mínimo necessário de contato do óleo essencial e da formulação de enxaguatório bucal com os micro-organismos para poder inibi-los ou eliminá-los e determinar o número de micro-organismos viáveis ao longo do tempo;
- Avaliar a citotoxicidade do óleo essencial puro e do enxaguatório bucal contendo óleo essencial de *Casearia sylvestris*;
- Avaliar a ação na rugosidade superficial, microdureza superficial, cor e análise qualitativa da superfície por meio da Microscopia Eletrônica de Varredura do enxaguatório contendo óleo essencial de *Casearia sylvestris* sobre materiais restauradores odontológicos estéticos.

Material e Método

4 MATERIAL E MÉTODO

Os ensaios descritos neste trabalho foram realizados em parceria interinstitucional. O processo de extração do óleo essencial, os estudos da atividade antimicrobiana e a análise química do óleo essencial foram conduzidos sob co-orientação da Profa. Dra. Nieve Araçari Jacometti Cardoso Furtado, do Departamento de Ciências Farmacêuticas da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – USP, sendo a análise por cromatografia a gás acoplada à espectrometria de massas realizada no laboratório de Química Orgânica do Departamento de Física e Química da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – USP em colaboração com o Prof. Dr. Norberto Peporine Lopes, a análise de citotoxicidade foi executada junto às dependências do Departamento Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – USP, em conjunto com a Profa. Dra. Maria José Vieira Fonseca e, a análise da influência das substâncias em teste sobre os materiais odontológicos foi realizada nos laboratórios do Departamento de Dentística Restauradora e Departamento de Materiais Dentários e Prótese da Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto – USP.

4.1 Procedimentos Fitoquímicos

4.1.1 Material vegetal

Folhas secas de *Casearia sylvestris* (Figura 1 e 2) foram adquiridas da empresa Oficina de Ervas Produtos Naturais. Razão Social: Eliza Tomoe Harada EPP (CNPJ 08.898.383/0001-79), localizada na Rua Otto Benz, 548 – Nova Ribeirânia – Ribeirão Preto – SP. Farmacêutico responsável: Marcelo Barrachi – CRF39443. Autorização expedida pela ANVISA: CEVS 354340218-477-000401-1-8.

As folhas foram colhidas no mês de agosto, e então foram trituradas e acondicionadas em pote de vidro devidamente identificado, com tampa para evitar contato com ar e umidade (Figura 3).

Figura 1: *Casearia sylvestris*.

Fonte: própria

Figura 2: Folhas da *Casearia sylvestris*.

Figura 3: Acondicionamento das folhas trituradas de *Casearia sylvestris*.

4.1.2 Obtenção do óleo essencial

A fração de componentes voláteis da planta foi obtida (Figura 4) por hidrodestilação utilizando-se Aparelho de Clevenger (Esquema 1 e Figura 5), seguindo os parâmetros da Farmacopéia Brasileira V edição. Assim, utilizou-se um balão de 2000mL contendo 800mL de água como líquido de destilação e 160g da droga vegetal triturada. A destilação foi realizada por 4 horas.

Figura 4: Componentes voláteis – Óleo essencial.

Esquema 1: Aparelho de Clevenger.

Figura 5: Aparelho de Clevenger.

4.2 Análise do óleo essencial por Cromatografia a gás acoplada à Espectrometria de massas

A amostra do óleo essencial obtido no processo de hidrodestilação foi submetida à análise por Cromatografia a gás acoplada a espectrometria de massas para identificar os compostos majoritários.

Os espectros de massas fornecem os pesos moleculares e o perfil de fragmentação de cada componente. Assim, por comparação dos dados obtidos com os da Biblioteca Wiley é possível identificar os constituintes majoritários. As análises foram realizadas em equipamento Shimadzu, modelo GC/MS QP-2010 (Figura 6), equipado com fonte de ionização por elétrons (IE) e analisador do tipo quadrupolar. As condições cromatográficas utilizadas foram as seguintes: coluna ZB-5MS (30mx 0.25mm x 0.25um) – Phenomenex, temperatura do injetor de 230°C e hidrogênio como fase móvel (fluxo de gás: 1 mL. min⁻¹). A temperatura da coluna foi mantida inicialmente a 60°C por 1 minuto, aumentando para 240°C em 10 minutos, permanecendo nesta temperatura por 60 minutos.

Após eluição, as amostras foram direcionadas pelo divisor de fluxo para a fonte de ionização, na razão de 1:40. A temperatura da fonte foi ajustada em 250°C e a energia do feixe de elétrons foi de 70 eV. O analisador foi controlado para separar íons de m/z entre 40 e 400.

Figura 6: Equipamento Shimadzu, modelo GC/MS QP-2010.

4.3 Avaliação da Atividade Antimicrobiana do óleo essencial da *Casearia sylvestris*

4.3.1 Micro-organismos que foram utilizados nos ensaios

Foram utilizados os seguintes micro-organismos provenientes da American Type Culture Collection (ATCC): *Streptococcus mutans* ATCC 25175, *Streptococcus mitis* ATCC 49456, *Streptococcus sanguinis* ATCC 10556, *Streptococcus salivarius* ATCC 25975 e *Enterococcus faecalis* ATCC 4082. Os itens abaixo descrevem os procedimentos realizados e no esquema 2, está apresentado um resumo do experimento realizado.

4.3.2 Determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM)

A Concentração Inibitória Mínima é definida como a menor concentração da amostra capaz de inibir completamente o crescimento bacteriano (GALES et al. 2002). Para determinação dos valores de CIM, foi utilizado o método de microdiluição em microplaca segundo a metodologia preconizada pelo “National Committee for Clinical Laboratory Standards” (NCCLS, 2006), atualmente denominado Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI), com adaptações, empregando a resazurina como revelador do crescimento bacteriano (Carvalho et al. 2009). Os experimentos foram realizados em triplicata (n=3).

4.3.2.1 Preparo do inóculo

Foram utilizadas, para o preparo dos inóculos, bactérias com crescimento de 24h em ágar sangue. No preparo dos inóculos, o primeiro tubo foi padronizado em espectrofotômetro (Biospectro SP 220, PR, Brasil) em 625 nm para a obtenção de turvação da escala 0,5 de MacFarland, correspondente a $1,5 \times 10^8$ UFC/mL.

A seguir, foram realizadas sucessivas diluições até a obtenção de 10 mL de caldo Triptona de Soja (TSB – Difco Laboratories, Detroit, Mich.) contendo $2,5 \times 10^6$ UFC/mL.

Em seguida, 20 µL dos inóculos foram adicionados às microplacas (TPP, Switzerland, Alemanha) e o volume final em todos os poços foi de 100µL com um inóculo de 5×10^5 UFC/mL.

4.3.2.2 Preparo das amostras

Com auxílio de balança analítica digital, (Sartoris BL2105, Alemanha) o óleo essencial foi pesado e solubilizado em dimetilsulfóxido (DMSO – Sigma – Aldrich, MO, EUA). Posteriormente, caldo TSB foi adicionado para a obtenção de soluções nas concentrações de 500µg/mL, 100µg/mL, 12,5µg/mL e 8µg/mL para os protocolos que variam de 20 a 400µg/mL, 4 a 80µg/mL, 0,5 a 10µg/mL e 0,004 a 2µg/mL respectivamente. Com esse procedimento foram preparadas soluções denominadas de soluções mães, as quais foram utilizadas para determinação dos valores de CIM.

4.3.2.3 Preparo do antibiótico padrão

O antibiótico padrão utilizado para validação da técnica foi o dicloridrato de clorexidina (Sigma - Aldrich, MO, EUA). O sal da clorexidina foi pesado, solubilizado em água destilada esterilizada e posteriormente diluído em caldo TSB e adicionado às microplacas. As concentrações testadas para a droga padrão foi de 0,0115 a 5,9 µg/mL.

4.3.2.4 Realização da técnica

Em microplacas esterilizadas de 96 poços foram adicionados meio de cultura (TSB) e soluções mães do óleo essencial e do antibiótico padrão previamente preparadas. As suspensões (20µL) dos micro-organismos foram colocadas por último obtendo-se sempre um volume final de 100µL por poço.

Para todas as bactérias testadas foi realizado o controle do solvente (DMSO) na concentração utilizada para solubilização das amostras e, também, em cada placa foram realizados os controles do crescimento, de esterilidade do caldo, de esterilidade do óleo essencial e do antibiótico padrão.

As placas foram incubadas a 37°C em estufa bacteriológica com atmosferas adequadas por 24h. Após o período de incubação foi adicionados em cada poço 30µL de solução aquosa de resazurina (7-hidroxi-3H-fenoxazina-3-ona-10-óxido) na concentração de 0,02% (Sigma–Aldrich, MO, USA). A leitura dos resultados foi observada pela mudança ou permanência de coloração da mesma (PALOMINO et al., 2002) (Figura 7).

Figura 7: A- Resazurina 0,02%, B- Aplicação da Resazurina, C- Leitura dos resultados.

4.3.3 Determinação da Concentração Bactericida Mínima (CBM)

A Concentração Bactericida Mínima é considerada a menor concentração na qual não há crescimento bacteriano visível (CARVALHO, 2009). Os valores de CBM foram determinados nos ensaios realizados em triplicata.

Para esta avaliação, 2µl de cada poço da CIM foram inoculados em ágar sangue (Ebefarma Bio Agro Ltda., RJ, Brasil) e as placas foram incubadas a 37°C, por 24 horas, em estufa bacteriológica, em microaerofilia ou aerobiose, com posterior avaliação do crescimento bacteriano (Figura 8).

Figura 8: Ensaio para determinação da Concentração Bactericida Mínima. A- Placa contendo ágar sangue; B e C- transferência do conteúdo dos poços para a placa.

Esquema 2: Representação gráfica dos experimentos realizados para determinação dos valores de CIM e CBM.

4.4 Citotoxicidade do óleo essencial

4.4.1 Cultura de Células de Fibroblastos de Camundongos (L929)

As células de fibroblastos de camundongo da linhagem L929 foram adquiridas do Banco de Células do Rio de Janeiro. Essas foram cultivadas em meio de cultura Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM - Sigma – Aldrich, MO, EUA), suplementado com 10% de soro fetal bovino (SBF - Sigma – Aldrich, MO, EUA), penicilina (100U/mL - Sigma – Aldrich, MO, EUA), estreptomicina (0,1mg/mL - Sigma – Aldrich, MO, EUA) e anfotericina B (0,25µg/mL - Sigma – Aldrich, MO, EUA); e incubadas a 37°C com 5% de CO₂. As células foram sub-cultivadas a cada 2-3 dias com a renovação do meio de cultura (substituição do meio presente na garrafa por um meio novo). Os ensaios foram realizados em triplicata (n=3), esse n representa a quantidade de repetições de placa, no entanto, em cada placa foram realizadas 8 repetições para cada concentração testada.

4.4.2 Tripsinização

Após 7 dias de cultura das células, foi realizada a tripsinização que consiste na desagregação das células da garrafa de cultivo (TPP, Switzerland, Alemanha). Para o processo de tripsinização, primeiramente, realizou-se a lavagem das células adicionando-se 26ml de solução salina 0,9% e agitou-se por 3 minutos e, em então, a solução foi descartada. Feito esse procedimento, adicionou-se a garrafa de cultura de células 18 ml de salina 0,9% e 2ml de tripsina/EDTA 0,25% (Gibco-BRL Invitrogen, NY, EUA) e incubou-a por 1 minuto a 37°C. Após este tempo, realizou-se o desprendimento das células com agitação brusca da garrafa e adicionou-se 20 ml de meio de cultura completo (meio de cultura DMEM, suplementado com 10% SBF, penicilina, estreptomicina e anfotericina B). A solução obtida foi transferida para o tubo falcon (TPP, Switzerland, Alemanha) e o mesmo foi levado para a centrífuga (5810 R, Eppendorf do Brasil Ltda., SP, Brasil) nas seguintes condições: 1000 rpm, durante 15 minutos, a temperatura de 10°C e aceleração/desaceleração 9/9. Com esse procedimento, formou-se um pellet (Figura 9), o qual o sobrenadante foi desprezado e o pellet ressuspensionado com 15 ml de meio de cultura completo, para então, realizar a contagem das células e o plaqueamento com a suspensão de células obtida (Esquema 3).

Esquema 3: Representação esquemática da tripsinização e do plaqueamento das células.

Figura 9: Pellet.

4.4.3 Plaqueamento

Para a contagem do número de células, uma amostra de 20µl da suspensão concentrada de células foi inserida na câmara de Neubauer (Improved, Precicolor HGB, Alemanha) (Figuras 10), levada ao microscópio óptico (Opton) (Figura 11) e realizada a contagem do número de células nos quatro quadrantes da extremidade da câmara. A partir dessa contagem, obteve-se o número de células presentes em 1 mL de suspensão e assim, foi possível preparar uma suspensão diluída de células da qual alíquotas de 200 µL foram inoculadas em cada poço da microplaca de 96 poços resultando em uma densidade de $0,5 \times 10^5$ células/poço. As microplacas foram conservadas nas condições de temperatura e atmosfera descritas anteriormente, durante 24 horas (Figura 12).

Figura 10: Adição de 20µl de suspensão de células na Câmara de Neubauer.

Figura 11: Microscópio

Figura 12: Plaqueamento.

4.4.4 Preparo e adição das amostras

A amostra do experimento foi preparada acrescentando-se no óleo essencial 0,5% de DMSO e 0,5% de Tween 20 (Synth SP, Brasil). Agitou-se esta mistura em agitador tipo vórtex por aproximadamente 1 minuto ou até completa solubilização do óleo obtendo-se assim, uma solução mãe.

Após 24 horas do plaqueamento, uma confluência em torno de 80% de fibroblastos foi observada no fundo dos poços. O meio suprajacente à essas células foi removido e em cada coluna foram adicionados 200 μ L de uma solução contendo concentrações diferentes de óleo essencial (180 μ L de meio de cultura incompleto, mais 20 μ L de óleo essencial nas seguintes concentrações: Placa 1 - 1- 2000 μ L, 2- 1500 μ L, 3- 1000 μ L, 4- 750 μ L + CLOREXIDINA, 5- 750 μ L, 6- 500 μ L, 7- 375 μ L, 8- 250 μ L, 9- 125 μ L), controle de solvente (solução mãe – 0,5% de DMSO e 0,5% de Tween 20), controle de células e controle com a solução padrão (dicloridrato de clorexidina). Na placa 2: nesta placa só foram realizadas as concentrações 1- 4000 μ L e 2- 3500 μ L além dos controles. Sendo a distribuição conforme o esquema 4.

Esquema 4: Concentrações e distribuição nas placas de 96 poços.

Após o tratamento das células com as diferentes concentrações do óleo essencial, e com os controles, um grupo permaneceu em contato com as células durante 30 minutos e outro grupo por 24 horas, sendo que estas microplacas foram incubadas a 37°C com 5% de dióxido de carbono. Este experimento foi realizado em triplicata para cada condição.

Transcorrido o período determinado (30 minutos ou 24 horas), uma solução do corante metiltetrazolium (3-[4,5- dimetiltiazol-2-il]-2,5-difeniltetrazolio brometo- MTT – Sigma-Adrich, EUA) foi adicionada as células de fibroblastos. Este procedimento consistiu na lavagem dos poços da microplaca com 200µl de solução salina 0,9% (duas vezes), em seguida, adicionou-se 200µl de meio incompleto (somente DMEM) e 10µl de MTT. O corante permaneceu em contato com as células por 4h em incubadora a 37°C com 5% de CO₂ e, em seguida, foram realizadas as leituras através do leitor de microplacas.

4.4.5 Leitura das microplacas

Para realizar a leitura das microplacas, primeiramente foi necessário, um preparo das mesmas que consistiu em: retirar toda a solução do corante MTT, adicionar 200µl de DMSO e 25µl de tampão glicina 0,2M, pH 10,2 (Synth, SP, Brasil) em todos os poços desta microplaca, inclusive nos poços destinados a calibração (Branco) e protegê-la da luz.

Feito o preparo das microplacas foram realizadas as leituras através de espectrofotômetro Bio-Rad iMark (Bio-Rad, Hercules, CA, USA) que realiza a leitura das absorvâncias, sendo que para o corante utilizado o comprimento de onda é 570nm (Figuras 13 e 14). A viabilidade celular foi expressa em porcentagem de células viáveis em relação ao grupo controle sem tratamento (Esquema 5) e, em seguida. Tendo sido obtida as porcentagens, foi determinada a realização da análise estatística, por meio de aplicação de aderência à curva normal, o que definiu a utilização de teste não-paramétrico Kruskal-Wallis ($p \leq 0,05$). Para esta análise estatística utilizou-se o programa estatístico GMC - versão 2002.

Figura 13: Espectrofotômetro (Bio-Rad, Hercules, CA, USA)

Figura 14: Posicionamento da placa dentro do equipamento.

Esquema 5: Colocação das diferentes concentrações do óleo essencial e leituras das microplacas.

4.5 Desenvolvimento de Formulação de enxaguatório bucal contendo óleo essencial de *Casearia sylvestris*

Para o desenvolvimento da formulação, foram buscadas na literatura e nos sites das maiores indústrias de enxaguatórios bucais, a composição usada no preparo dos mesmos. A partir de estudos de excipientes e de legislação brasileira quanto às quantidades máximas permitidas de cada excipiente, foram selecionadas as seguintes matérias-primas: princípio ativo, base desta pesquisa: óleo essencial de *Casearia sylvestris*, Tween 20, Coco Amidopropilbetaína, BHT (butil hidroxitolueno), Phenova (Mistura de parabenos), EDTA dissódico, Sorbitol 70%, Sacarina sódica, Ácido Cítrico, Citrato de sódio e Água Destilada.

4.6 Avaliação da atividade antimicrobiana do enxaguatório bucal à base do óleo essencial de *Casearia sylvestris*

Os micro-organismos que foram utilizados nos ensaios nesta fase foram os mesmos utilizados nos ensaios antimicrobianos para o óleo essencial puro. Os procedimentos realizados para determinação dos valores de Concentração Inibitória Mínima (CIM), Concentração Bactericida Mínima (CBM), foram desenvolvidos da mesma forma como para o ensaio do óleo essencial puro. Apenas houve mudança no preparo das amostras, pois como se trata de uma solução pronta, não foi necessária a dissolução da amostra em solventes, além disso, testou-se a título de comparação a clorexidina 0,12% (controle positivo) e o Listerine (Jonhonsen & Jononson, São Paulo, Brasil), cujas composições estão no quadro 2.

4.7 Curva de morte

4.7.1 Micro-organismos que foram utilizados nos ensaios

Neste experimento utilizou-se o micro-organismo *Streptococcus mutans* ATCC 25175.

4.7.2 Determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM)

Como descrito no item 4.3.2

4.7.3 Preparo das amostras e solução padrão

Para o desenvolvimento desta metodologia utilizou-se o enxaguatório a base de *Casearia sylvestris* em sua versão final, bem como o mesmo enxaguatório, sem o princípio ativo (óleo essencial). Também foi utilizado o Listerine que apresenta uma formulação a base de óleo essencial e está disponível no mercado. A clorexidina utilizada foi preparada da mesma forma como para a determinação do CIM e CBM.

4.7.4 Realização da técnica

O experimento foi realizado nos tempos de 10 minutos, 30 minutos e 24 horas, utilizando-se uma placa de 96 poços para cada uma das amostras: óleo de *Casearia sylvestris*, formulação sem óleo de *Casearia sylvestris*, formulação com óleo de *Casearia sylvestris*, dicloridrato de clorexidina e Listerine (Johnson & Johnson do Brasil Indústria e Comércio de Produtos para a Saúde Ltda, SP, Brasil).

Para cada uma das amostras, na primeira fileira, foi realizada a diluição seriada. No caso do óleo essencial foi realizada até o poço 4. A determinação deste poço é com base no resultado de CBM, inicialmente realizado. Assim, até o poço 4 foram adicionados 80 µL de TSB e, no primeiro poço adicionaram-se também 80 µL de óleo de *Casearia sylvestris*, e, a partir daí foi realizada a diluição seriada. Após esse procedimento acrescentaram-se 20µL de inóculo, aguardou-se 10 minutos e, do quarto poço retirou-se 20µl o qual foi colocado em uma placa de ágar sangue.

Em seguida, 10µL deste mesmo poço foi adicionado a um poço qualquer da placa contendo 90µL de solução salina, para a realização da diluição seriada em 3 poços. Assim, de cada uma dessas diluições (10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3}) foi retirada uma amostra de 20µL e colocada em

diferentes placas de ágar sangue. Este procedimento é realizado com o objetivo de propiciar a obtenção de placas com número de unidades formadoras de colônia passível de ser contado.

Na segunda fileira, realiza-se o mesmo procedimento, no entanto, somente após 30 minutos é retirada uma amostra de 20 µL e colocada em placa de Petri e, também somente após esse período, é que se realiza as demais diluições. E, por fim na terceira fileira o tempo esperado após a colocação do inóculo é de 24 horas.

Também foi realizado os controles de caldo e do inóculo nas mesmas concentrações testadas para as amostras.

Após a colocação das amostras nas diferentes concentrações nas placas de ágar sangue, foi realizado o espalhamento da amostra com o auxílio de alça de Drigalski esterelizada. As placas foram então incubadas em câmara de microaerofilia em estufa a 37°C por 24 horas. Após esse período as mesmas foram observadas em zona asséptica para determinação do número de UFC. Para todas as demais amostras os procedimentos foram os mesmos, exceto que: para a formulação sem óleo de *Casearia sylvestris*, foi feita a diluição seriada até o poço 8, para a formulação com óleo de *Casearia sylvestris* até o poço 10, para o dicloridrato de clorexidina até o poço 4 e para o listerine até o poço 3 (Esquema 6).

Esquema 6: Representação esquemática de uma das placas de 96 poços (óleo essencial).

4.8 Citotoxicidade do Enxaguatório Bucal à base do óleo essencial de *Casearia sylvestris*

As células de fibroblastos de camundongos (L929) foram as mesmas utilizadas para os ensaios de citotoxicidade do óleo essencial, bem como a tripsinização, o plaqueamento, a adição do corante MTT e a leitura das microplacas. A amostra utilizada foi o enxaguatório bucal na sua versão final e a título de comparação realizaram-se os testes com o enxaguatório bucal sem o óleo essencial, a clorexidina 0,12% (controle positivo) e com o Listerine, no entanto, nesta fase testou-se apenas em 30 minutos de exposição ao enxaguatório.

4.9 Ensaios de Alteração de cor, Rugosidade superficial e Microdureza superficial de materiais odontológicos estéticos submetidos ao enxaguatório experimental à base de óleo essencial de *Casearia Sylvestris*

4.9.1 Delineamento Experimental

Após a obtenção do óleo essencial de *Casearia sylvestris* e da formulação do enxaguatório bucal à base de óleo de *Casearia sylvestris* foi avaliada a ação destes sobre as propriedades dos materiais restauradores. Para isso, foi realizado experimento piloto que permitiu determinar os níveis dos fatores em estudo e padronizar a técnica de confecção dos corpos de prova utilizados para os testes, estabelecendo as condições de estudo e controlando os fatores que poderiam interferir na análise. Para o estudo, utilizaram-se três tipos de material restaurador independentes entre eles: resina composta e ionômero de vidro. Os fatores em estudo foram a *Solução* e o *Tempo* que estão descritas com suas respectivas siglas e diferentes níveis, a seguir:

A - Fator Solução para bochecho (S) – com 3 níveis:

S₁ - Gluconato de Clorexidina 0,12% (Controle positivo).

S₂ - Enxaguatório bucal experimental a base do óleo essencial da *Casearia sylvestris*.

S₃ - Água destilada (Controle negativo).

B – Fator Tempo (T) – com 2 níveis:

T₀ – Tempo inicial

T₁ – Após 14 dias

4.9.2 Delineamento estatístico

A amostra do experimento foi de 60 corpos de prova, sendo $n=10$ para cada condição experimental. Assim, para a Rugosidade superficial foi estabelecida a realização de seis leituras (três iniciais e três finais) para cada corpo de prova, totalizando 360 leituras, já para a variável alteração de cor e os parâmetros L^* , a^* e b^* foram estabelecidas um total de 120 leituras (60 iniciais e 60 finais) e, para a análise de Microdureza superficial foram realizadas 8 leituras (4 iniciais e 4 finais) para cada corpo de prova, totalizando 480 leituras.

As variáveis de respostas contínuas foram:

- A. Alteração de cor (ΔE^*)
- B. Rugosidade superficial (R_a)
- C. Microdureza Superficial (KN)

A seleção da análise estatística adequada foi realizada por meio de aplicação de aderência à curva normal, o que definiu a utilização de teste paramétrico ANOVA, e teste complementar de Tukey, para todas as variáveis estudadas. Para esta análise estatística utilizou-se o programa estatístico GMC - versão 2002.

O esquema 7 apresenta o resumo do experimento para os ensaios de materiais.

4.9.3 Obtenção dos corpos de prova de resina composta

Para a confecção dos corpos de prova foi empregada a resina composta Z250 (3M ESPE, SP, Brasil) na cor A2 (Figura 15) cujas especificações apresentam-se descritas no Quadro 1. Os corpos de prova foram confeccionados com auxílio de uma matriz de teflon de 6 mm de diâmetro e 2 mm de espessura (Figura 16). A resina composta foi inserida na matriz em incremento único com auxílio de espátula de Titâneo dupla (Millennium, Golgran, SP, Brasil). Após a inserção do material, uma matriz de poliéster (K-Dent, Quimidrol, SC, Brasil) sob uma lamínula de vidro foi posicionada na superfície do espécime e uma carga de 1kg foi colocada sobre a lamínula de vidro (Golgran, SP, Brasil) durante 30s para garantir que toda a matriz fosse preenchida e para que o excesso de material extravase. Após a remoção da carga foi realizada a fotopolimerização do material com auxílio de um aparelho fotopolimerizado Optilight LD Max (LED Gnatus, SP, Brasil) (Figura 17) conforme indicação do fabricante

(Quadro 1). A cada fotopolimerização, a potência (600 mW/cm^2) do aparelho foi monitorada com auxílio de um radiômetro (RD7, Ecel, SP, Brasil). Após a fotopolimerização os corpos de prova foram sacados da matriz e mantidos em água destilada (Figura 18) durante 24 horas em estufa à temperatura de $37 \pm 1^\circ\text{C}$, para então, serem polidos com discos Super Snap (Shofu Dental Corporation, Kyoto, Japan) em seqüência decrescente de granulação, intercalados com o umedecimento da superfície do corpo de prova com a finalidade de impedir o superaquecimento e consequentemente alteração da superfície. Uma das faces dos corpos de prova foi devidamente identificada servindo como guia para o posicionamento do espécime no Rugosímetro, no Colorímetro espectrofotométrico e no Microdurômetro. Durante todo o experimento os corpos de prova foram mantidos em água destilada à temperatura de $37 \pm 1^\circ\text{C}$.

Figura 15 - Resina composta.

Figura 16 - Matriz de teflon.

**Figura 17 -
Fotopolimerizador.**

**Figura 18 –
Armazenamento em
água destilada.**

4.9.4 Obtenção dos corpos de prova do Cimento de Ionômero de Vidro Tipo II

Para a confecção dos corpos de prova de ionômero de vidro foi empregado o ionômero de vidro Vitremer (3M-ESPE, Sumaré, SP, Brasil) na cor B2 (Figura 19) cujas especificações apresentam-se descritas no Quadro 1. Os corpos de prova foram confeccionados com auxílio de uma matriz de teflon (6 x 2mm) (Figura 16).

O material foi manipulado de acordo com as indicações do fabricante, levado à matriz e após a inserção do material, uma matriz de poliéster sob uma lamínula de vidro foi posicionada na superfície do espécime e uma carga de 1kg foi colocada sobre a lamínula de vidro durante 40s para garantir que toda a matriz fosse preenchida e para que o excesso de material extravasasse. Após a remoção da carga foi realizada a fotopolimerização do material com auxílio de um aparelho fotopolimerizado Optilight LD Max (Figura 18) conforme indicação do fabricante (Quadro 1). A cada fotopolimerização, a potência (600 mW/cm^2) do aparelho foi monitorada com auxílio de um radiômetro. Após a fotopolimerização os corpos de prova foram sacados da matriz e receberam o protetor de superfície (3M-ESPE, SP, Brasil) indicado pelo fabricante, em seguida, foram mantidos em estufa por 24 horas à temperatura de $37 \pm 1^\circ\text{C}$ para então serem polidos com discos Super Snap (Shofu) em sequência decrescente de granulação. Uma das faces dos corpos de prova foi devidamente identificada servindo como guia. Durante todo o experimento os corpos de prova foram mantidos em água destilada à temperatura de $37 \pm 1^\circ\text{C}$.

Figura 19 – Cimento de Ionômero de Vidro utilizado.

Quadro 1 - Características dos materiais restauradores utilizados.

Material	Composição	Tempo de Fotopolimerização	Fabricante
Z250	Matriz orgânica: Bis-GMA, UDMA, Bis-EMA e canforoquinona. Parte inorgânica: Zircônia/Sílica com 82% em peso (60% em volume).	20 seg	3M - ESPE, Sumaré, SP, Brasil
Vitremer	Pó: pó de vidro fluoraluminosilicato, difenil-iodocloro. Líquido: 10-15% de ac. acrílico e itacônico, 40-55% de 2-idroxiethylmetacrilato (HEMA), 35-45% de água.	40 seg	3M-ESPE, Sumaré, SP, Brasil

4.9.5 Leituras

4.9.5.1 Leituras Alteração de cor

As leituras de Alteração de cor foram realizadas após o polimento dos mesmos e após 24 horas do término do período experimental. Para a avaliação de cor foi empregado o espectrofotômetro modelo SP62S com Software Modelo QA Master I (X-Rite Incorporated - Neu-Isenburg Alemanha– Figura 20 – FAPESP Processo: 2012/08185-7), com abertura focal de 4 mm e a geometria esférica de medição d/8° de iluminação e ângulo de observação de 10°. Cada corpo de prova foi cuidadosamente manipulado por meio de uma pinça clínica (Millennium, Golgran, SP, Brasil), evitando o contato manual do avaliador, o que poderia depositar resíduos e/ou gordura e influenciar os valores que foram encontrados. Os corpos de prova foram também cuidadosamente secos com papel absorvente para impedir interferências da umidade nos valores de alteração de cor (DINELLI et al., 1996; BRANDÃO et al., 2007).

No momento da leitura Figura 21, os corpos de prova foram colocados sobre um dispositivo branco, devidamente preparado para que pudessem ser feitas as leituras na posição correta Figura 22.

O aparelho de colorimetria emite luz com ondas na faixa de 400 a 700 nm sobre o objeto e mede a reflexão deste espectro.

Para objetos translúcidos, o valor da cor do pano de fundo é adicionado ao valor da cor do objeto. Para se padronizar o valor destas medidas, os corpos de prova foram colocados sobre o bloco de fundo de cor branca e opaca.

Através do sistema de cor CIE L* a* b* foram obtidas as medidas de cor. O ΔE^* , ou seja, diferença total entre dois estímulos de cor foi calculada pela seguinte fórmula:

$$\Delta E^* = \sqrt{(\Delta L^*)^2 + (\Delta a^*)^2 + (\Delta b^*)^2}.$$

O sistema CIE L*a*b* utiliza três parâmetros para definir cor: luminosidade, matiz e saturação (Comission Internationale De Leclairage, 1978). A luminosidade representa o grau de claro e escuro do objeto representado pelo valor de L*, sendo L* = 100 para branco e L* = 0 para preto. Os parâmetros de a* e b*, chamados de escala cromática (matiz), representam o vermelho se +a* e verde se -a*, amarelo se +b* e azul se -b* (SCHULZE et al., 2003). A saturação é a intensidade do matiz e é dada pelo valor numérico de a* e b*. Os valores de ΔL^* , Δa^* , Δb^* , correspondem à diferença dos valores de L*, a*, b*, respectivamente, em comparação a primeira leitura de cor (inicial).

Figura 20 – Espectrofotômetro modelo SP62S (X-Rite Incorporated - Neu-Isenburg Alemanha).

Figura 21 – Leitura de cor.

Figura 22– Dispositivo devidamente preparado com nichos para a colocação dos corpos de prova e padronização das leituras em fundo branco e opaco.

4.9.5.2 Leitura da Rugosidade Superficial

As leituras de rugosidade superficial foram realizadas após o polimento dos mesmos e após 24 horas do término do período experimental. Para tais leituras foram utilizados o Rugosímetro SJ-201 P/M (Mitutoyo, Tokyo, Japão) (Figura 23). Este equipamento possibilita a avaliação da rugosidade superficial média (R_a), em micrometros, sendo sua faixa máxima de medição $300\mu\text{m}$ ($\pm 150\mu\text{m}$).

A rugosidade superficial média é assim chamada devido ao fato de que este instrumento registra a média entre os picos e vales da superfície do material avaliado.

Este instrumento é constituído essencialmente de uma unidade de controle e registro de leitura, e por uma unidade transversal acoplada a uma haste vertical.

A unidade transversal acoplada à haste vertical é composta por um motor e por uma agulha, sendo a agulha a responsável pela sondagem da superfície do espécime, detectando as irregularidades da superfície do material.

Na unidade de controle e registro de leitura foram programadas as leituras, sendo determinada e padronizada a distância de $0,8 \times 5\mu\text{m}$ que foi percorrida pela ponta de medição.

Para cada corpo de prova foram tomadas três medidas de rugosidade superficial sendo que o valor utilizado para análise estatística foi a média aritmética desses valores.

Figura 23 – Rugosímetro SJ-201 P/M (Mitutoyo, Tokyo, Japão).

4.9.5.3 Leitura de Microdureza Superficial

As leituras de microdureza superficial foram realizadas após o polimento dos mesmos e após 24 horas do término do período experimental. Para esta análise foi utilizado um microdurômetro (HVM-2000 Shimadzu Corporation, Japan – Figura 24) com um penetrador diamantado piramidal, tipo Knoop (Figura 25) com carga diferente para os 3 tipos de materiais estudados, sendo assim utilizou-se: para a resina composta 150g, aplicada por 15 segundos e para o cimento de ionômero de vidro 50g por 10 segundos. Em cada corpo de prova foram realizadas 4 impressões, com 100µm de distância entre as mesmas. Os resultados da dureza Knoop foram obtidos automaticamente através do cálculo da seguinte equação:

$$KHN = C \cdot c / d^2$$

KHN= valor de dureza Knoop, C (constante)= 14,230, c= carga, d= comprimento da maior diagonal da impressão.

Após a obtenção das quatro impressões, foi realizada uma média com os valores e assim, foi obtido o número resultante da dureza Knoop para cada corpo de prova.

Figura 24– Microdurômetro (HVM-2000 Shimadzu Corporation, Japan).

Figura 25– 4 impressões, com 100µm de distância entre as mesmas.

4.9.6 Imersão dos corpos de prova

Os corpos de prova foram mantidos em estufa $37 \pm 1^\circ\text{C}$ durante todo o período do experimento. Durante 14 dias (Yap et al, 2003) os corpos de prova foram imersos 2 vezes ao dia durante 1 minuto cada em 15 ml das soluções propostas (Quadro 2). Assim o grupo 1 foi imerso apenas em água destilada (Figura 26), o grupo 2 foi imerso no enxaguatório bucal à base de óleo essencial de *Casearia sylvestris* (Figura 27) e o grupo 3 foi imerso em gluconato de clorexidina 0,12% (Figura 28). As imersões foram realizadas em constante agitação. Após as 24 horas das imersões foram realizadas novas leituras de cor, rugosidade superficial e microdureza superficial conforme já descrito anteriormente.

Figura 26– Água destilada

Figura 27– Enxaguatório à base de óleo essencial da *Casearia sylvestris*.

Figura 28– Gluconato de clorexidina 0,12%.

Quadro 2 – Soluções empregadas ao longo dos experimentos.

Solução	Composição
Água Destilada	-
Enxaguatório à base de óleo essencial de <i>Casearia sylvestris</i>	Composição citada em tópico oportuno.
Gluconato de clorexidina 0,12%	Gluconato de Clorexidina 0,12%; nipagin; mentol, álcool etílico, água destilada.
Listerine Zero	Água, Timol, Mentol, Metil Salicilato, Eucaliptol, Aroma, Sorbitol, Lauril sulfato de sódio, Poloxamer 407, Sacarina Sódica, Sucralose, Ácido Benzoico, Benzoato sódico, Cl 42053, Propileno glicol.

4.10 Análise superficial qualitativa por meio de um Microscópio Eletrônico de Varredura (MEV) dos materiais odontológicos estéticos submetidos ao enxaguatório bucal experimental de *Casearia Sylvestris*

A observação microscópica teve como objetivo ilustrar as características topográficas da superfície dos materiais restauradores, essa análise foi realizada no laboratório de Microscopia Eletrônica de Varredura no Departamento de Química da Faculdade de Filosofia de Ciências e Letras de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo.

Para isso, foi confeccionada uma amostra de cada grupo experimental que teve sua superfície analisada por um microscópio eletrônico de varredura. Foi realizada uma leitura para cada grupo após 24 horas da imersão nas soluções propostas. Para o desenvolvimento do experimento, as amostras foram fixadas em suportes de alumínio utilizando fita adesiva à base de carbono (Nisshin Em. Co., Ltd.). Em seguida, as mesmas foram recobertas com fina camada de ouro em pó em um pulverizador Bal-Tec mod. SCD 050 Sputter Coater (Fürstentum Liechtestein) (Figura 29). A análise morfológica das amostras foi realizada em um Microscópio Eletrônico de Varredura Zeiss mod. EVO 50 (Cambridge, UK) (Figura 30). Todas as fotomicrografias registradas apresentam informações sobre ampliação, escala e voltagem de aceleração do feixe eletrônico.

Figura 29– Pulverizador de ouro, Bal-Tec mod. SCD 050 Sputter Coater (Fürstentum Liechtestein)

Figura 30– Microscópio Eletrônico de Varredura Zeiss mod. EVO 50 (Cambridge, UK)

Resultados

5 RESULTADOS

A seguir estão descritos todos os resultados obtidos em cada uma das etapas de análise deste trabalho:

5.1 Rendimento do processo de obtenção do óleo essencial

A quantidade de óleo essencial obtida no processo de extração das folhas secas coletadas no mês de agosto foi 0,85mL/100 g folhas secas.

5.2 Análise dos constituintes do óleo essencial de *Casearia sylvestris* por Cromatografia a gás acoplada à Espectrometria de massas (CG/EM)

De acordo com a metodologia utilizada foi possível identificar os constituintes majoritários como: β -cariofileno, germacreno-D, biciclogermacreno, δ -cadideno, óxido de cariofileno, espatulenol e α -elemol. Nas figuras 31 e 32, estão apresentados, respectivamente, o cromatograma e as estruturas químicas dos constituintes majoritários identificados.

Figura 31 Cromatograma do óleo essencial de *Casearia sylvestris*. 1: β -cariofileno (RT=24.933); 2: germacreno-D (RT=27.457); 3: biciclogermacreno (RT=28.103); 4: δ -cadideno (RT=28.720); 5: óxido de cariofileno (RT=31.492); 6: espatulenol (RT=31.411) e 7: α -elemol (RT=50.054).

Figura 32 Estruturas químicas dos constituintes identificados por CG/EM; 1: β – cariofileno; 2: Germacreno – D; 3: δ -cadideno; 4: α -elemol; 5: Biciclogermacreno; 6: Epatulenol; 7- Óxido de cariofileno.

5.3 CIM e CBM para o óleo essencial da *Casearia sylvestris*

Os ensaios foram realizados em uma faixa de concentração que variou de 0,004 a 400 μ g/mL. Valores abaixo de 400 μ g/mL representam na literatura (RÍOS e RECIO, 2005) bons valores de atividade antimicrobiana, sendo que valores abaixo de 100 μ g/mL para extratos e frações são considerados promissores.

O óleo essencial apresentou valores de Concentração Inibitória e Bactericida Mínima promissores para o desenvolvimento de formulações com ação antimicrobiana, como apresentado na tabela 1.

Tabela 1 - Valores de CIM e CBM do óleo essencial de *Casearia sylvestris*, em µg/mL

BACTÉRIA	ÓLEO ESSENCIAL		Controle	
	CIM	CBM		
<i>S. mutans</i> / 25175	25	50	Clor. 0,369 µg/mL	DMSO >5%
<i>S. mitis</i> / 49456	100	200	Clor. 2,95 µg/mL	DMSO >5%
<i>S. salivarius</i> / 25975	100	200	Clor. 1,475 µg/mL	DMSO >5%
<i>S.sanguinis</i> / 10556	100	100	Clor. 0,7375µg/mL	DMSO >5%
<i>E.fecalis</i> / 4082	-	-	Clor. 5,9 µg/mL	DMSO >5%

Concentrações do óleo testado = 0,195 a 400 µg/mL (Diluição seriada)

Concentrações do controle positivo testados = 0,01 a 5,9µg/mL

Obs: Clor = Clorexidina

-: atividade não detectada nas concentrações avaliadas.

5.4 Citotoxicidade do óleo essencial de *Casearia sylvestris*

Para análise estatística dos dados (Apêndice A), aplicou-se o teste de aderência à curva normal que demonstrou que a distribuição amostral foi não normal (Tabela 2) para os resultados de citotoxicidade de diferentes concentrações do óleo essencial de *Casearia sylvestris* em dois tempos distintos. Assim, realizou-se o teste não-paramétrico – Kruskal Wallis (Quadro 3), cujas comparações entre postos estão em anexo (Anexo B).

Tabela 2 - Teste de aderência à curva normal: citotoxicidade do óleo essencial de *Casearia sylvestris*.

A. Frequências por intervalos de classe:							
Intervalos de classe:	M-3s	M-2s	M-1s	Med.	M+1s	M+2s	M+3s
-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
Curva normal :	0.44	5.40	24.20	39.89	24.20	5.40	0.44
Curva experimental :	1.28	3.85	16.67	53.85	14.10	8.97	0.00
B. Cálculo do Qui-quadrado:				Interpretação			
-----				-----			
Graus de liberdade :	4	A distribuição amostral testada					
Valor do Qui quadrado :	14.25	não é normal					
Probabilidade de Ho :	0.6500 %	-----					

O teste de Kruskal Wallis para a citotoxicidade do óleo essencial de *Casearia sylvestris* demonstrou que houve significância estatística ($p \leq 0,01$). (Quadro 3).

Quadro 3 - Resultados do teste não-paramétrico – Kruskal Wallis para a citotoxicidade do óleo essencial de *Casearia sylvestris*.

Resultados do teste de Kruskal-Wallis	
Valor (H) de Kruskal-Wallis calculado :	70.3438
Valor do X^2 para 3 graus de liberdade :	70.31
Probabilidade de H_0 para esse valor :	0.00 %
Significante ao nível de 1 % (alfa = 0,01)	
O valor de H aparece repetido como X^2 porque a sua significância é avaliada pela tabela do qui-quadrado.	

Analisando-se o apêndice B de comparação entre médias dos postos das amostras e o gráfico 1, verificou-se que houve diferença estatisticamente significativa entre os Tempos T1 (30 minutos) e T2 (24 horas) para todas as Soluções, exceto para a concentração de 750 μ g/ml associada à clorexidina. Já para as Soluções, nota-se que para T1 (o quadro 4) a clorexidina mostrou-se diferente estatisticamente de todas as concentrações testadas, assim a clorexidina apresenta menor porcentagem de viabilidade celular que as diferentes concentrações de óleo essencial de *Casearia sylvestris*. Através do quadro 4, para o tempo de 30 minutos e o quadro 5 para o tempo de 24 horas, pode-se verificar onde houve ou não diferença estatisticamente significativa entre as diferentes soluções testadas. A clorexidina associada ao óleo também apresentou diferenças significantes das concentrações puras de óleo essencial, apenas igual estatisticamente à concentração de 2000 μ g/ml.

Gráfico 1 - Viabilidade celular (%) da interação: Soluções (concentrações de óleo essencial e controles positivo e negativo) e Tempo.

Quadro 4 - Representação esquemática das diferenças estatisticamente significantes, da viabilidade celular das diferentes concentrações de óleo essencial, no Tempo de 30 minutos.

4000	3200	2000	1500	1000	750+CHX	750	500	375	250	125	Sm	CHX
-	4000	4000	4000	4000	4000	4000	4000	4000	4000	4000	4000	4000
3200	-	3200	3200	3200	3200	3200	3200	3200	3200	3200	3200	3200
2000	2000	-	2000	2000	2000	2000	2000	2000	2000	2000	2000	2000
1500	1500	1500	-	1500	1500	1500	1500	1500	1500	1500	1500	1500
1000	1000	1000	1000	-	1000	1000	1000	1000	1000	1000	1000	1000
750+CHX	750+CHX	750+CHX	750+CHX	750+CHX	-	750+CHX	750+CHX	750+CHX	750+CHX	750+CHX	750+CHX	750+CHX
750	750	750	750	750	750	-	750	750	750	750	750	750
500	500	500	500	500	500	500	-	500	500	500	500	500
375	375	375	375	375	375	375	375	-	375	375	250	250
250	250	250	250	250	250	250	250	250	-	250	375	375
125	125	125	125	125	125	125	125	125	125	-	125	125
Sm	Sm	Sm	Sm	Sm	Sm	Sm	Sm	Sm	Sm	Sm	-	Sm
CHX	CHX	CHX	CHX	CHX	CHX	CHX	CHX	CHX	CHX	CHX	CHX	-

* Para melhor visualização das diferenças entre todas as soluções montou-se o quadro acima. Na 1ª. linha constam as soluções (em azul), que quando comparadas com as soluções das suas próprias colunas, apresentam-se em cor azul quando tem-se igualdade estatística e quando diferente é preenchidas com cor rosa.

Chx – clorexidina

Sm – solução mãe

Quadro 5 - Representação esquemática das diferenças estatisticamente significantes, da viabilidade celular das diferentes concentrações de óleo essencial, no Tempo de 24 horas.

4000	3200	2000	1500	1000	750+CHX	750	500	375	250	125	Sm	CHX
-	4000	4000	4000	4000	4000	4000	4000	4000	4000	4000	4000	4000
3200	-	3200	3200	3200	3200	3200	3200	3200	3200	3200	3200	3200
2000	2000	-	2000	2000	2000	2000	2000	2000	2000	2000	2000	2000
1500	1500	1500	-	1500	1500	1500	1500	1500	1500	1500	1500	1500
1000	1000	1000	1000	-	1000	1000	1000	1000	1000	1000	1000	1000
750+CHX	750+CHX	750+CHX	750+CHX	750+CHX	-	750+CHX	750+CHX	750+CHX	750+CHX	750+CHX	750+CHX	750+CHX
750	750	750	750	750	750	-	750	750	750	750	750	750
500	500	500	500	500	500	500	-	500	500	500	500	500
375	375	375	375	375	375	375	375	-	375	375	375	375
250	250	250	250	250	250	250	250	250	-	250	250	250
125	125	125	125	125	125	125	125	125	125	-	125	125
Sm	Sm	Sm	Sm	Sm	Sm	Sm	Sm	Sm	Sm	Sm	-	Sm
CHX	CHX	CHX	CHX	CHX	CHX	CHX	CHX	CHX	CHX	CHX	CHX	-

* Para melhor visualização das diferenças entre todas as soluções montou-se o quadro acima. Na 1ª. linha constam as soluções (em azul), que quando comparadas com as soluções das suas próprias colunas, apresentam-se em cor azul quando tem-se igualdade estatística e quando diferente é preenchidas com cor rosa.

Chx – clorexidina

Sm – solução mãe

5.5 Concentração Inibitória Mínima e Concentração Bactericiada Mínima do enxaguatório

Os ensaios foram realizados para: Formulação sem óleo essencial, Formulação com óleo essencial de *Casearia sylvestris* e Listerine em suas apresentações inicialmente puras (100%) e, em seguida, foram feitas sucessivas diluições obtendo-se as concentrações de: 50%, 25%, 12,5%, 6,25%, 3,12%, 1,56%, 0,78%, 0,39%, 0,19%, 0,09% e 0,04%; e, para a Clorexidina utilizou-se o protocolo que varia entre 0,0115 a 5,9 µg/mL.

Os valores da Concentração Inibitória Mínima e da Concentração Bactericida Mínima para a Formulação sem o óleo essencial, a Formulação com óleo essencial de *Casearia sylvestris* e o Listerine encontram-se resumidos nas tabelas 3, 4 e 5, respectivamente.

Tabela 3 - Valores de CIM e CBM da Formulação sem óleo essencial de *Casearia sylvestris* (FSOE), em % (clorexidina em µg/mL).

BACTÉRIA	FSOE		Controle	
	CIM	CBM		
<i>S. mutans</i> / 25175	0,78	0,78*	Clor. 0,369µg/mL	DMSO >5%
<i>S. mitis</i> / 49456	0,39	0,39*	Clor. 2,95µg/mL	DMSO >5%
<i>S. salivarius</i> / 25975	0,39	0,78	Clor. 1,475µg/mL	DMSO >5%
<i>S.sanguinis</i> / 10556	0,39	0,39*	Clor. 1,475µg/mL	DMSO >5%
<i>E.fecalis</i> / 4082	0,78	0,78*	Clor. 2,95µg/mL	DMSO >5%

Obs: Clor = Clorexidina

* Bactericida

Tabela 4 - Valores de CIM e CBM da Formulação com óleo essencial de *Casearia sylvestris* (FCOE), em % (clorexidina em µg/mL).

BACTÉRIA	FCOE		Controle	
	CIM	CBM		
<i>S. mutans</i> / 25175	0,19	0,19*	Clor. 0,369µg/mL	DMSO >5%
<i>S. mitis</i> / 49456	0,09	0,09*	Clor. 2,95µg/mL	DMSO >5%
<i>S. salivarius</i> / 25975	0,19	0,19*	Clor. 1,475µg/mL	DMSO >5%
<i>S.sanguinis</i> / 10556	0,19	0,19*	Clor. 1,475µg/mL	DMSO >5%
<i>E.fecalis</i> / 4082	0,19	0,39	Clor. 2,95µg/mL	DMSO >5%

Obs: Clor = Clorexidina

* Bactericida

Tabela 5 - Valores de CIM e CBM para o Listerine, em % (clorexidina em µg/mL).

BACTÉRIA	FCOE		Controle	
	CIM	CBM		
<i>S. mutans</i> / 25175	1,56	1,56*	Clor. 0,369µg/mL	DMSO >5%
<i>S. mitis</i> / 49456	1,56	1,56*	Clor. 2,95µg/mL	DMSO >5%
<i>S. salivarius</i> / 25975	1,56	1,56*	Clor. 1,475µg/mL	DMSO >5%
<i>S.sanguinis</i> / 10556	1,56	1,56*	Clor. 1,475µg/mL	DMSO >5%
<i>E.fecalis</i> / 4082	6,25	25,0	Clor. 2,95µg/mL	DMSO >5%

Obs: Clor = Clorexidina

* Bactericida

5.6 Curva de morte

Com o objetivo de investigar o tempo de contato necessário entre a formulação desenvolvida e o micro-organismo *S. mutans*, iniciador da cárie dental, para total eliminação do micro-organismo, o efeito da formulação foi avaliado não apenas após 24 horas de contato, como preconizado nos ensaios antimicrobianos, mas também após 10 e 30 minutos. Neste experimento, foram avaliados também, nas mesmas condições, a formulação sem o óleo essencial de *Casearia sylvestris*, o antibiótico padrão clorexidina e o enxaguatório comercial Listerine.

No gráfico 2 estão apresentadas as curvas de morte, sendo que no eixo Y está o número de unidades formadoras de colônia de *S. mutans* e no eixo X o tempo de contato entre as amostras e o micro-organismo.

As quatro amostras analisadas (formulações com e sem o óleo essencial de *Casearia sylvestris*, o antibiótico padrão clorexidina e o enxaguatório comercial Listerine) não apresentaram ação bactericida nas concentrações avaliadas nos tempos menores de 24 horas. Entretanto, observa-se redução mais acentuada do número de micro-organismos viáveis após 10 minutos de contato quando se utilizou o enxaguatório comercial Listerine e a formulação contendo óleo essencial de *Casearia sylvestris*, quando comparados à formulação sem óleo essencial de *Casearia sylvestris* e a clorexidina. Após 30 minutos de contato, houve maior redução do número de micro-organismos viáveis em todas as amostras analisadas, mas não foi ainda suficiente para eliminação total do número de células viáveis, o que ocorreu somente após 24 horas de contato em todas as amostras avaliadas.

Gráfico 2 - Médias de viabilidade celular (%) para a citotoxicidade de diferentes enxaguatórios bucais em função do Tempo.

5.7 Citotoxicidade do Enxaguatório a base de óleo essencial de *Casearia sylvestris*

Os dados de porcentagem (%) de células viáveis após exposição a diferentes enxaguatórios obtidos estão agrupados no apêndice C.

Para análise estatística dos dados aplicou-se o teste de aderência à curva normal que demonstrou que a distribuição amostral foi não normal (Tabela 6), sendo assim foi utilizado o teste não-paramétrico, Kruskal Wallis.

Tabela 6 - Teste de aderência à curva normal: Citotoxicidade dos diferentes enxaguatórios bucais.

A. Frequências por intervalos de classe:							
Intervalos de classe:	M-3s	M-2s	M-1s	Med.	M+1s	M+2s	M+3s
-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
Curva normal :	0.44	5.40	24.20	39.89	24.20	5.40	0.44
Curva experimental :	0.00	8.33	16.67	50.00	16.67	8.33	0.00
B. Cálculo do Qui-quadrado:				Interpretação			
-----				-----			
Graus de liberdade :	4	A distribuição amostral testada					
Valor do Qui quadrado :	10.44	não é normal					
Probabilidade de Ho :	3.3600 %	-----					

O teste de Kruskal Wallis para a citotoxicidade do enxaguatório a base de óleo essencial de *Casearia sylvestris* demonstrou que houve significância estatística ($p \leq 0,05$). (Quadro 5).

Quadro 5 - Resultados do teste não-paramétrico – Kruskal Wallis, para a citotoxicidade de diferentes enxaguatórios bucais.

Resultados do teste de Kruskal-Wallis	
Valor (H) de Kruskal-Wallis calculado :	9.9744
Valor do X^2 para 3 graus de liberdade :	9.97
Probabilidade de H_0 para esse valor :	1.88 %
Significante ao nível de 5 % (alfa = 0,05)	
O valor de H aparece repetido como X^2 porque a sua significância é avaliada pela tabela do qui-quadrado.	

Analisando-se o gráfico 2 e a tabela 7 de comparação entre médias dos postos das amostras, verificou-se que o enxaguatório com óleo de *Casearia sylvestris* e o enxaguatório sem óleo de *Casearia sylvestris*, não apresentaram diferença de comportamento estatisticamente significativa, enquanto que as demais comparações apresentaram diferença estatística entre elas.

Tabela 7 -Teste de Kruskal Wallis - Comparação entre médias dos postos dos diferentes enxaguatórios testados.

Amostras comparadas (comparações duas a duas)				Diferenças entre médias			Valores críticos (Ó)			Signifi- cância
							0,05	0,01	0.001	
E+O	X	E	:	2.3333	2.4307	3.5365	5.3137			ns
E+O	X	L	:	3.3333	2.4307	3.5365	5.3137			5 %
E+O	X	CHX	:	6.3333	2.4307	3.5365	5.3137			0,1 %
E	X	L	:	5.6667	2.4307	3.5365	5.3137			0,1 %
E	X	CHX	:	8.6667	2.4307	3.5365	5.3137			0,1 %
L	X	CHX	:	3.0000	2.4307	3.5365	5.3137			5 %

E+O – Enxaguatório à base óleo essencial de *Casearia sylvestris*.

E – Enxaguatório sem óleo essencial de *Casearia sylvestris*.

L – Listerine

CHX - Clorexidina

Gráfico 2 - Médias de viabilidade celular (%) frente a diferentes enxagatatórios bucais.

5.8 Alteração de cor dos materiais restauradores estéticos

A alteração de cor (ΔE^*) é o resultado do efeito conjunto dos parâmetros L^* , a^* e b^* , sendo assim, além da análise da variável ΔE^* , realizou-se também, a análise estatística para esses parâmetros, quando houve diferença estatisticamente significativa para ΔE^* , com o intuito de se obter informações complementares à alteração de cor, que pudessem auxiliar na melhor compreensão dos resultados da variável.

5.8.1 Resina composta

Os dados de alteração de cor (ΔE^*) e dos parâmetros L^* , a^* , b^* obtidos, para a resina composta estão agrupados nos apêndices D, E, F e G.

Para análise estatística dos dados aplicou-se o teste de aderência à curva normal que demonstrou que a distribuição amostral foi normal para ΔE^* e para os parâmetros L^* , a^* e b^* (Tabela 8, 9, 10 e 11, respectivamente), sendo assim foi utilizado o teste paramétrico, análise de variância.

Tabela 8 - Teste de aderência à curva normal: Valores originais de ΔE^* da resina composta.

A. Frequências por intervalos de classe:							
Intervalos de classe:	M-3s	M-2s	M-1s	Med.	M+1s	M+2s	M+3s
-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
Curva normal	: 0.44	5.40	24.20	39.89	24.20	5.40	0.44
Curva experimental	: 0.00	3.33	30.00	40.00	16.67	10.00	0.00
B. Cálculo do Qui-quadrado:				Interpretação			
-----				-----			
Graus de liberdade	: 4	A distribuição amostral testada					
Valor do Qui quadrado	: 8.44	é normal					
Probabilidade de Ho	: 7.6600 %	-----					

Tabela 9 - Teste de aderência à curva normal: Valores originais de L^* da resina composta.

A. Frequências por intervalos de classe:							
Intervalos de classe:	M-3s	M-2s	M-1s	Med.	M+1s	M+2s	M+3s
-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
Curva normal	: 0.44	5.40	24.20	39.89	24.20	5.40	0.44
Curva experimental	: 0.00	3.33	21.67	41.67	28.33	3.33	0.00
B. Cálculo do Qui-quadrado:				Interpretação			
-----				-----			
Graus de liberdade	: 4	A distribuição amostral testada					
Valor do Qui quadrado	: 2.63	é normal					
Probabilidade de Ho	: 62.1100 %	-----					

Tabela 10 - Teste de aderência à curva normal: Valores originais de a^* da resina composta.

A. Frequências por intervalos de classe:							
Intervalos de classe:	M-3s	M-2s	M-1s	Med.	M+1s	M+2s	M+3s
-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
Curva normal	: 0.44	5.40	24.20	39.89	24.20	5.40	0.44
Curva experimental	: 0.00	5.00	28.33	41.67	16.67	8.33	0.00
B. Cálculo do Qui-quadrado:				Interpretação			
-----				-----			
Graus de liberdade	: 4	A distribuição amostral testada					
Valor do Qui quadrado	: 4.75	é normal					
Probabilidade de Ho	: 31.3600 %	-----					

Tabela 11 - Teste de aderência à curva normal: Valores originais de b* da resina cmoposta.

A. Frequências por intervalos de classe:

Intervalos de classe:	M-3s	M-2s	M-1s	Med.	M+1s	M+2s	M+3s
-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
Curva normal :	0.44	5.40	24.20	39.89	24.20	5.40	0.44
Curva experimental :	0.00	5.00	28.33	33.33	23.33	10.00	0.00

B. Cálculo do Qui-quadrado:

Interpretação

Graus de liberdade :	4	A distribuição amostral testada
Valor do Qui quadrado :	5.76	é normal
Probabilidade de Ho :	21.7600 %	

5.8.1.1 Delta E (ΔE^*)

O resumo da análise de variância para a variável alteração de cor (ΔE^*) encontra-se na Tabela 12 a seguir.

Tabela 12 - Análise de variância: ΔE^* da resina composta.

Fonte de Variação	Soma de Quadr.	G.L.	Quadr.Médios	(F)	Prob. (H0)
-----	-----	-----	-----	-----	-----
SOLUÇÃO (S)	2.3871	2	1.1935	4.23	2.455 %
Resíduo	7.6138	27	0.2820		
Variação total	10.0009	29			
Significância ($p \leq 0,05$)					

A análise de variância demonstrou haver significância ($p \leq 0,05$) para o fator Solução (Tabela 12). Isto é:

Analisando-se a Tabela 13 de médias de alteração de cor, para o fator Solução estudado, verificou-se que a Solução à base de óleo essencial de *Casearia Sylvestris* determinou média de alteração de cor estatisticamente diferente e maior que a média determinada pela clorexidina e igual estatisticamente ao grupo controle (Gráfico 3).

Tabela 13 - Médias de alteração de cor (ΔE^*) da resina composta para o fator Solução.

Controle	Solução a base de óleo essencial de <i>Casearia sylvestris</i>	Clorexidina
1,29 AB	1,73 B	1,04 A

*Letras diferentes, significam diferença estatisticamente significante;

Valor crítico de Tuckey: 0,58

Dp.: $\pm 0,17$

Gráfico 3 - Médias de Alteração de cor (ΔE^*) da resina composta para o fator Solução.

5.8.1.2 Parâmetro L*

A análise de variância para o parâmetro L* demonstrou que para o fator Tempo isoladamente, e para as interações Tempo x Solução houve significância estatística ($p \leq 0,01$), enquanto que para o fator Solução isoladamente, não teve efeito significativo (Tabela 14).

Para análise e identificação das diferenças foi aplicado o teste complementar de Tukey ($p \leq 0,01$).

Tabela 14 - Análise de Variância: Parâmetro L*

Fonte de Variação	Soma de Quadr.	G.L.	Quadr.Médios	(F)	Prob.(H0)
TEMPO (T)	10.1146	1	10.1146	145.65	0.0001 %
Resíduo I	1.2500	18	0.0694		
SOLUÇÃO(S)	0.2813	2	0.1406	1.58	21.9404 % ns
Interação TxS	0.9854	2	0.4927	5.52	0.8208 %
Resíduo II	3.2125	38	0.0892		
Variação total	15.8438	59			

Significância ($p \leq 0,01$); ns - não significativa.

A seguir são analisadas as diferentes tabelas de médias para o parâmetro L*.

a) FATOR TEMPO

As médias de L* obtidas para o fator Tempo, isoladamente, estão agrupadas na Tabela 15. De acordo com a análise estatística, este fator teve efeito significativo sobre a luminosidade, assim, a média apresentada em T0 (inicial) foi menor que em T1 (14 dias), o que quer dizer que a luminosidade varia de acordo com o tempo de imersão (Gráfico 4).

Tabela 15 - Médias do parâmetro L* da resina composta para o fator Tempo.

T0	T1
78,15 A	78,97 B

*Letras diferentes, significam diferença estatisticamente significativa.
Valor crítico de Tuckey: 0,19
Dp.: ± 0,05

Gráfico 4 - Médias do parâmetro L* da resina composta para o fator Tempo

b) FATOR SOLUÇÃO

O fator Solução, quando analisado isoladamente, não teve efeito significativo sobre a luminosidade (L*). Assim, foi confeccionada a Tabela 16 e o Gráfico 5.

Tabela 16 - Médias do parâmetro L* da resina composta para o fator Solução.

Controle	Solução a base de óleo essencial de <i>Casearia sylvestris</i>	Clorexidina
78,65	78,56	78,48

*ns

Dp.: ±0,07

Gráfico 5 - Médias do parâmetro L* da resina composta para o fator Solução.

c) INTERAÇÃO SOLUÇÃO X TEMPO

A Tabela 17 e o Gráfico 6 e 7, de médias do parâmetro L* da resina composta para a interação Solução x Tempo, quando analisados, constatou-se que, no sentido das linhas, as Soluções apresentaram maior média de luminosidade no Tempo Inicial (T0) do que aos 14 dias (T1). No sentido das colunas, tanto em T0 quanto em T1, as Soluções, apresentaram médias estatisticamente iguais.

Tabela 17 - Médias do parâmetro L* da resina composta para a interação Solução x Tempo.

	Inicial (T0)	14 dias (T1)
Controle	78,09 Aa	79,21 Bb
Solução a base de óleo essencial de <i>Casearia sylvestris</i>	78,13 Ac	78,98 Bd
Clorexidina	78,24 Ae	78,73 Bf

*Letras maiúsculas comparação entre colunas e letras minúsculas comparação entre linhas respectivas.

*Letras diferentes, significam diferença estatisticamente significativa.

Valor crítico de Tukey: 0,48

Dp.: ±0,09

Gráfico 6 - Médias do parâmetro L* da resina composta para a interação Tempo x Solução.

Gráfico 7 - Médias do parâmetro L* da resina composta para a interação Solução x Tempo.

5.8.1.3 Parâmetro a*

A análise de variância para o parâmetro a* demonstrou que apenas o fator Tempo teve efeito significativo estatisticamente sobre este parâmetro ($p \leq 0,01$) (Tabela 18).

Para análise e identificação das diferenças, foi aplicado o teste complementar de Tukey ($p \leq 0,01$).

Tabela 18 - Análise de Variância: Para o Parâmetro a* da resina composta.

Fonte de Variação	Soma de Quadr.	G.L.	Quadr.Médios	(F)	Prob. (H0)
TEMPO (T)	0.4150	1	0.4150	20.79	0.0433%
Resíduo I	0.3594	18	0.0200		
SOLUÇÃO (S)	0.0053	2	0.0027	0.13	12.2109% ns
Interação TxS	0.0313	2	0.0156	0.77	47.4374% ns
Resíduo II	0.7311	36	0.0203		
Variação total	1.5421	59			

Significância ($p \leq 0,01$)

ns - não significativa estatisticamente.

A seguir são analisadas as diferentes tabelas de médias para o parâmetro a*.

a) FATOR TEMPO

As médias obtidas do parâmetro a* para o fator Tempo, isoladamente, estão agrupadas na Tabela 19. De acordo com a análise estatística este fator apresentou efeito significativo sobre o parâmetro a*. A média obtida em T0 foi menor que em T1. O que quer dizer que o parâmetro a* tem uma tendência ao vermelho com o passar do tempo (Gráfico 8).

Tabela 19 - Médias do parâmetro a* da resina composta para o fator Tempo.

T0	T1
0,72 A	0,88 B

*Letras diferentes, significam diferença estatisticamente significativa.
Valor crítico de Tuckey: 0,10
Dp.: $\pm 0,02$

Gráfico 8 - Médias do parâmetro a* da resina composta para o fator Tempo.

b) FATOR SOLUÇÃO

As médias obtidas do parâmetro a^* para o fator Solução, isoladamente, estão agrupadas na Tabela 20. De acordo com a análise estatística este fator não apresentou efeito significativo sobre o parâmetro a^* , ou seja, os diferentes tipos de soluções utilizadas não influenciam este parâmetro (Gráfico 9).

Tabela 20 - Médias do parâmetro a^* da resina composta para o fator Solução.

Controle	Solução a base de óleo essencial de <i>Casearia sylvestris</i>	Clorexidina
0,81	0,80	0,79

*ns

Dp.:±0,03

Gráfico 9 - Médias do parâmetro a^* da resina composta para o fator Solução.

c) INTERAÇÃO SOLUÇÃO X TEMPO

A Tabela 21 e o Gráfico 10, de médias do parâmetro a^* da resina composta para a interação Solução x Tempo, mostra que esta interação não teve efeito sobre o parâmetro em estudo.

Tabela 21 - Médias do parâmetro a^* da resina composta para a interação Solução x Tempo.

	Inicial (T0)	14 dias (T1)
Controle	0,71	0,92
Solução a base de óleo essencial de <i>Casearia sylvestris</i>	0,74	0,84
Clorexidina	0,71	0,89

*ns

Dp.: $\pm 0,04$ **Gráfico 10** - Médias do parâmetro a^* da resina composta para a interação Tempo x Solução.

5.8.2 Parâmetro b^*

A análise de variância para o parâmetro b^* demonstrou haver significância ($p \leq 0,01$) para o fator Tempo, enquanto que para o fator Solução e para a interação Tempo x Solução não tiveram efeito estatisticamente significantes (Tabela 22).

Para constatação das diferenças, foi aplicado o teste complementar de Tukey ($p \leq 0,01$).

Tabela 22 - Análise de Variância: Parâmetro b^*

Fonte de Variação	Soma de Quadr.	G.L.	Quadr. Médios	(F)	Prob. (H0)
TEMPO (T)	14.6487	1	14.6487	157.61	0.0001 %
Resíduo I	1.6729	18	0.0929		
SOLUÇÃO (S)	0.2320	2	0.1160	1.25	29.8833 % ns
Interação TxS	0.4216	2	0.2108	2.27	11.6237 % ns
Resíduo II	3.3451	36	0.0929		
Variação total	20.3203	59			

Significância ($p \leq 0,01$)

ns - não significativa estatisticamente.

A seguir são analisadas as diferentes tabelas de médias para o parâmetro b^* .

a) FATOR TEMPO

As médias obtidas do parâmetro b^* para o fator Tempo, isoladamente, estão agrupadas na Tabela 23. De acordo com a análise estatística este fator apresentou efeito significativo sobre o parâmetro b^* , assim a média apresentada em T1 foi menor que em T0. O que quer dizer que o parâmetro b^* tem uma tendência ao azul com o passar do tempo (Gráfico 11).

Tabela 23 - Médias do parâmetro b^* da resina composta para o fator Tempo.

T0	T1
19,66 A	18,67 B

*Letras diferentes significam diferença estatisticamente significativa.

Valor crítico de Tuckey: 0,22

Dp.: $\pm 0,05$

Gráfico 11 - Médias do parâmetro b^* da resina composta para o fator Tempo.

b) FATOR SOLUÇÃO

As médias obtidas do parâmetro b^* para o fator Solução, isoladamente, estão agrupadas na Tabela 24 e visualizado no Gráfico 12. De acordo com a análise estatística este fator não apresentou efeito significativo sobre o parâmetro b^* , ou seja, os diferentes tipos de soluções utilizadas não influenciam neste parâmetro.

Tabela 24 - Médias do parâmetro b* da resina composta para o fator Solução.

Controle	Solução a base de óleo essencial de <i>Casearia sylvestris</i>	Clorexidina
19,25	19,13	19,11

*ns

Dp.:±0,07

Gráfico 12 - Médias do parâmetro b* da resina composta para o fator Solução.

c) INTERAÇÃO SOLUÇÃO X TEMPO

Esta interação não teve efeito significativo sobre este parâmetro. Na Tabela 25 e o Gráfico 13, constam as médias do parâmetro b* da resina composta para a interação Solução x Tempo.

Tabela 25 - Médias do parâmetro b* da resina composta para a interação Solução x Tempo.

	Inicial (T0)	14 dias (T1)
Controle	19,68	18,83
Solução a base de óleo essencial de <i>Casearia sylvestris</i>	19,74	18,52
Clorexidina	19,57	18,66

*ns

Dp.:±0,1

Gráfico 13 - Médias do parâmetro b^* da resina composta para a interação Tempo x Solução.

5.8.3 Cimento de Ionômero de vidromodificado por resina

Os dados de alteração de cor (ΔE^*) obtidos, para o cimento de ionômero de vidro modificado por resina estão agrupados nos anexos H.

Para análise estatística dos dados aplicou-se o teste de aderência à curva normal que demonstrou que a distribuição amostral foi normal para ΔE^* (Tabela 26) e, após análise de variância verificou-se que não houve diferenças estatisticamente significantes entre os grupos, assim, não se realizou a análise dos parâmetros L^* , a^* e b^* , visto que a análise destes parâmetros são utilizadas de forma complementar à análise da alteração de cor (ΔE^*) para ajudar no entendimento da variação de cor quando a mesma é significativa.

Tabela 26 - Teste de aderência à curva normal: Valores originais de ΔE^* do cimento de ionômero de vidro modificado por resina.

A. Frequências por intervalos de classe:							
Intervalos de classe:	M-3s	M-2s	M-1s	Med.	M+1s	M+2s	M+3s
-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
Curva normal	: 0.44	5.40	24.20	39.89	24.20	5.40	0.44
Curva experimental	: 0.00	10.00	23.33	36.67	23.33	6.67	0.00
B. Cálculo do Qui-quadrado:							
				Interpretação			
Graus de liberdade : 4				A distribuição amostral testada			
Valor do Qui quadrado: 4.54				é normal			
Probabilidade de Ho : 33.8000 %							

5.8.3.1 Delta E (ΔE^*)

O resumo da análise de variância para a variável alteração de cor (ΔE^*) do cimento de ionômero de vidro modificado por resina encontra-se na Tabela 27 a seguir.

Tabela 27- Análise de Variância: ΔE^* do cimento de ionômero de vidro modificado por resina.

Fonte de Variação	Soma de Quadr.	G.L.	Quadr.Médios	(F)	Prob. (H0)
SOLUÇÃO (S)	1.5410	2	0.7705	0.55	41.435 % ns
Resíduo	37.5024	27	1.3890		
Variação total	39.0435	29			

ns - não significativa estatisticamente.

A análise de variância não demonstrou haver significância para o fator em estudo (Tabela 27). As médias de alteração de cor (ΔE^*) para o fator Solução estão agrupadas na tabela 28 abaixo e representadas no Gráfico 14.

Tabela 28 - Médias de Alteração de cor (ΔE^*) do cimento de ionômero de vidro modificado por resina para o fator Solução.

Controle	Solução a base de óleo essencial de <i>Casearia sylvestris</i>	Clorexidina
5,58	5,66	5,14

*ns

Dp.:±0,37

Gráfico 14 - Médias de Alteração de cor (ΔE^*) do cimento de ionômero de vidro modificado por resina para o fator Solução.

5.9 Rugosidade Superficial dos materiais restauradores estéticos

5.9.1 Resina composta

Os dados de rugosidade superficial (Ra) para a resina composta estão agrupados no anexo I.

Para a análise estatística dos dados aplicou-se o teste de aderência à curva normal que demonstrou que a distribuição amostral foi normal para a variável rugosidade superficial (Tabela 29), sendo assim foi utilizado o teste paramétrico ANOVA.

Tabela 29 - Teste de aderência à curva normal: Valores originais para Rugosidade Superficial da resina composta.

A. Frequências por intervalos de classe:							
Intervalos de classe:	M-3s	M-2s	M-1s	Med.	M+1s	M+2s	M+3s
-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
Curva normal :	0.44	5.40	24.20	39.89	24.20	5.40	0.44
Curva experimental :	0.00	5.00	28.33	45.00	11.67	8.33	1.67
B. Cálculo do Qui-quadrado:				Interpretação			
Graus de liberdade : 4				A distribuição amostral testada é normal			
Valor do Qui quadrado : 9.47							
Probabilidade de Ho : 5.0300%							

Tabela 30 – Análise de Variância: Rugosidade Superficial da resina composta.

Fonte de Variação	Soma de Quadr.	G.L.	Quadr.Médios (F)	Prob.(H0)
-----	-----	-----	-----	-----
TEMPO (T)	0.0056	1	0.0056	0.35
Resíduo I	0.2850	18	0.0158	43.4520 %ns
SOLUÇÃO (S)	0.0423	2	0.0212	1.34
Interação TxS	0.0066	2	0.0033	0.21
Resíduo II	0.5695	36	0.0158	27.4678 %ns
Variação total	0.9090	59		18.6024 %ns

ns - não significante estatisticamente.

A Tabela 30 de resumo da análise de variância demonstrou não haver efeito estatisticamente significativo dos fatores e interação dos mesmos, sobre a rugosidade superficial da resina composta.

A seguir são apresentadas as tabelas de médias para a rugosidade superficial para os fatores e interações dos mesmos.

a) FATOR TEMPO

Foi construída a tabela de médias para o fator Tempo, isoladamente, apresentada a seguir (Tabela 31), e representada através do gráfico abaixo (Gráfico 15). Nota-se que não houve significância do fator Tempo na rugosidade superficial da resina composta nas condições experimentais deste estudo.

Tabela 31 - Médias de rugosidade superficial (μm) da resina composta para o fator Tempo.

Inicial (T0)	14 dias (T1)
0,27	0,25

*ns
Dp.: $\pm 0,02$

Gráfico 15 - Médias de rugosidade superficial (μm) da resina composta para o fator Tempo.

b) FATOR SOLUÇÃO

Foi construída a tabela de médias para o fator Solução, isoladamente, apresentada a seguir (Tabela 32), também por meio do Gráfico 16 pode se verificar as médias obtidas para o fator Solução. Para esse fator, também não teve efeito estatisticamente significativo.

Tabela 32 - Médias de rugosidade superficial (μm) da resina composta para o fator Solução.

Controle	Solução a base de óleo essencial de <i>Casearia sylvestris</i>	Clorexidina
0,29	0,23	0,26

*ns

Dp.: $\pm 0,03$ **Gráfico 16** - Médias de rugosidade superficial (μm) da resina composta para o fator Solução.

c) INTERAÇÃO TEMPO X SOLUÇÃO

Na Tabela 33 constam as médias de rugosidade superficial para a interação Tempo x Solução, que não determinou significância estatística. Isto confirma o comportamento dos fatores quando analisados isoladamente (Gráfico 17).

Tabela 33 - Médias de rugosidade superficial (μm) da resina composta para a interação Tempo x Solução

	T0 (inicial)	T1 (14 dias)
Controle	0,32	0,27
Solução a base de óleo essencial de <i>Casearia sylvestris</i>	0,23	0,23
CHX	0,26	0,26

*ns

Dp. $\pm 0,04$

Tabela 17 - Médias de rugosidade superficial (μm) da resina composta para interação Tempo x Solução.

5.9.2 Cimento de Ionômero de vidro modificado por resina

Os dados de rugosidade superficial (R_a) para o Cimento de Ionômero de vidro modificado por resina estão agrupados no anexo J.

Para a análise estatística dos dados aplicou-se o teste de aderência à curva normal que demonstrou que a distribuição amostral foi normal para a variável rugosidade superficial (Tabela 34), sendo assim foi utilizado o teste paramétrico ANOVA.

Tabela 34 - Teste de aderência a curva normal: valores originais para rugosidade superficial do Cimento de Ionômero de vidro modificado por resina.

A. Frequências por intervalos de classe:

Intervalos de classe:	M-3s	M-2s	M-1s	Med.	M+1s	M+2s	M+3s
Curva normal	0.44	5.40	24.20	39.89	24.20	5.40	0.44
Curva experimental	0.00	6.67	25.00	48.33	15.00	1.67	3.33

B. Cálculo do Qui-quadrado:

Graus de liberdade	:	4
Valor do Qui quadrado	:	8.19
Probabilidade de Ho	:	8.4900%

Interpretação

A distribuição amostral testada
é normal

Tabela 35 – Análise de variância: rugosidade superficial do Cimento de ionômero de vidro modificado por resina

Fonte de Variação	Soma de Quadr.	G.L.	Quadr.Médios (F)	Prob. (H0)
TEMPO (T)	2.5215	1	2.5215	6.76
Resíduo I	6.7171	18	0.3732	1.7266 %
SOLUÇÃO (S)	0.5380	2	0.2690	1.47
Interação TxS	5.1203	2	2.5602	14.01
Resíduo II	0.5695	36	0.0158	0.0109 %
Variação total	21.4745	59		

Significância ($p \leq 0,05$)

ns - não significante estatisticamente.

A Tabela 35 de resumo da análise de variância demonstrou haver diferença estatisticamente significativa para o fator Tempo isoladamente e para a interação Tempo x Solução, enquanto para o fator Solução isoladamente não houve diferença estatisticamente significativa.

A seguir são analisadas as diferentes tabelas de médias para a rugosidade superficial do ionômero de vidro.

a) FATOR TEMPO

As médias obtidas de rugosidade superficial (μm) do Cimento de Ionômero de vidro modificado por resina para o fator Tempo, isoladamente, estão agrupadas na Tabela 36. De acordo com a análise estatística este fator apresentou efeito significativo sobre a variável estudada, e verificou-se que a média de rugosidade em T0 foi menor que em T1 (Gráfico 18).

Tabela 36 - Médias de rugosidade superficial (μm) do Cimento de Ionômero de vidro modificado por resina para o fator Tempo.

T0 (inicial)	T1 (14 dias)
0,74 A	1,15 B
*Letras diferentes, significam diferença estatisticamente significativa.	
Valor crítico de Tuckey: 0,22	
Dp.: $\pm 0,11$

Gráfico 18 - Médias de rugosidade superficial (μm) do Cimento de ionômero de vidro modificado por resina para o fator Tempo.

b) FATOR SOLUÇÃO

As médias obtidas de rugosidade superficial do Cimento de Ionômero de vidro modificado por resina para o fator Solução, isoladamente, estão agrupadas na Tabela 36. De acordo com a análise estatística este fator não apresentou efeito significativo sobre a rugosidade superficial (Gráfico 19).

Tabela 36 - Médias de rugosidade superficial (μm) do Cimento de Ionômero de vidro modificado por resina para o fator Solução.

Controle	Solução a base de óleo essencial de <i>Casearia sylvestris</i>	Clorexidina
0,85	0,90	1,07

*ns

Dp.: $\pm 0,02$

Gráfico 19 - Médias de rugosidade superficial (μm) do Cimento de Ionômero de vidro modificado por resina para o fator Solução.

c) INTERAÇÃO SOLUÇÃO X TEMPO

A Tabela 37 e o Gráfico 20 e 21, de médias de rugosidade superficial do Cimento de Ionômero de vidro modificado por resina para a interação Solução x Tempo, quando analisados, verifica-se que houve diferença estatisticamente significante, sendo que no sentido das linhas não houve diferença estatisticamente significante em T0 e T1 para as soluções Controle e a Solução a base de óleo essencial de *Casearia sylvestris*, e sim para a clorexidina, que em T0 (inicial) apresentou menor média de rugosidade superficial comparado a T1 (14 dias).

Tabela 37 - Médias de rugosidade superficial (μm) do Cimento de Ionômero de vidro modificado por resina para a interação Solução x Tempo.

	Inicial (T0)	14 dias (T1)
Controle	0,65 Aa	1,05 Ba
Solução a base de óleo essencial de <i>Casearia sylvestris</i>	1,05 Ab	0,75 Bb
Clorexidina	0,51 Ac	1,64 Bd

*Letras maiúsculas comparação entre colunas e letras minúsculas comparação entre linhas.

*Letras diferentes, significam diferença estatisticamente significante.

Valor crítico de Tukey: 0,87

Dp.: $\pm 0,04$

Gráfico 20 - Médias de rugosidade superficial do cimento de ionômero de vidro modificado por resina para a interação Solução x Tempo.

Gráfico 21 - Médias de rugosidade superficial do cimento de ionômero de vidro modificado por resina para a interação Tempo x Solução.

5.10 Microdureza Superficial dos materiais restauradores estéticos

5.10.1 Resina composta

Os dados de microdureza superficial (KN) para a resina composta estão agrupados no anexo L.

Para a análise estatística dos dados aplicou-se o teste de aderência à curva normal que demonstrou que a distribuição amostral foi normal para a variável microdureza superficial (Tabela 38), sendo assim foi utilizado o teste paramétrico ANOVA.

Tabela 38 - Teste de aderência à curva normal: valores originais para microdureza superficial da resina composta.

A. Frequências por intervalos de classe:							
Intervalos de classe:	M-3s	M-2s	M-1s	Med.	M+1s	M+2s	M+3s
-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
Curva normal	: 0.44	5.40	24.20	39.89	24.20	5.40	0.44
Curva experimental	: 1.67	3.33	21.67	46.67	23.33	1.67	1.67
B. Cálculo do Qui-quadrado:				Interpretação			
Graus de liberdade : 4				A distribuição amostral testada é normal			
Valor do Qui quadrado : 4.82							
Probabilidade de Ho : 30.6300%							

Tabela 39 – Análise de Variância: microdureza superficial da resina composta.

Fonte de Variação	Soma de Quadr.	G.L.	Quadr.Médios(F)	Prob.(H0)		
-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
TEMPO (T)	207.6479	1	207.6479	4.03	5.7202	%ns
Resíduo I	926.9250	18	51.4958			
SOLUÇÃO (S)	210.7063	2	105.3531	2.32	10.9995	%ns
Interação TxS	57.9521	2	28.9760	0.64	46.2698	%ns
Resíduo II	1627.7063	36	45.2141			
Variação total	3030.9375	59				

ns - não significante estatisticamente.

A Tabela 39 de resumo da análise de variância demonstrou não haver efeito estatisticamente significativo dos fatores e interações estudadas sobre a microdureza superficial.

A seguir montaram-se as tabelas de médias para cada um dos fatores e a interação dos fatores em estudo.

a) FATOR TEMPO

Foi construída a tabela de médias para o fator Tempo, isoladamente, bem como o gráfico, apresentados a seguir (Tabela 40, gráfico 20). A análise dos mesmos demonstrou não haver diferença estatisticamente significativa para este fator sobre a microdureza superficial da resina composta.

Tabela 40 - Médias de microdureza superficial (KN) da resina composta para o fator Tempo.

Inicial (T0)	14 dias (T1)
66,30	70,02

* ns

Dp.: $\pm 1,31$

Gráfico 20 - Médias de microdureza superficial (KN) da resina composta para o fator Tempo.

b) FATOR SOLUÇÃO

A análise do fator Solução, isoladamente, para a microdureza superficial da resina composta estudada demonstrou que este fator não teve efeito estatisticamente significativo sobre essa variável. Ver Tabela 41 e Gráfico 21.

Tabela 41 - Médias de microdureza superficial (KN) da resina composta para o fator Solução.

Controle	Solução a base de óleo essencial de <i>Casearia sylvestris</i>	Clorexidina
70,77	67,23	66,47

*ns

Dp.: $\pm 1,5$ **Gráfico 21** - Médias de microdureza superficial (KN) da resina composta para o fator Solução.

c) INTERAÇÃO TEMPO X SOLUÇÃO

Na Tabela 42 e o Gráfico 22 constam as médias de microdureza superficial para a interação Tempo x Solução, que não determinou significância estatística.

Tabela 42 - Médias de microdureza superficial (KN) da resina composta para a interação Tempo x Solução.

	T0 (inicial)	T1 (14 dias)
Controle	69,69	71,85
Solução a base de óleo essencial de <i>Casearia sylvestris</i>	65,97	68,49
CHX	63,22	69,71

*ns

Dp. $\pm 2,13$

Gráfico 22 – Médias de Microdureza Superficial (KN) da resina composta para a interação Tempo x Solução.

5.10.2 Ionômero de vidro modificado por resina

Os dados de microdureza superficial (KN) para o Cimento de Ionômero de vidro modificado por resina estão agrupados no apêndice M.

Para a análise estatística dos dados aplicou-se o teste de aderência à curva normal que demonstrou que a distribuição amostral foi normal para a variável microdureza superficial (Tabela 43), sendo assim foi utilizado o teste paramétrico ANOVA.

Tabela 43 - Teste de aderência à curva normal: valores originais para microdureza superficial do Cimento de Ionômero de vidro modificado por resina.

A. Frequências por intervalos de classe:							
Intervalos de classe:	M-3s	M-2s	M-1s	Med.	M+1s	M+2s	M+3s
Curva normal :	0.44	5.40	24.20	39.89	24.20	5.40	0.44
Curva experimental :	0.00	5.00	25.00	46.67	15.00	8.33	0.00

B. Cálculo do Qui-quadrado:		Interpretação
Graus de liberdade :	4	A distribuição amostral testada é normal
Valor do Qui quadrado :	6.30	
Probabilidade de Ho :	17.8000%	

Tabela 44– Análise de Variância: Microdureza superficial do Cimento de Ionômero de vidro modificado por resina.

Fonte de Variação	Soma de Quadr.	G.L.	Quadr.Médios(F)	Prob.(H0)
TEMPO (T)	612.8666	1	612.8666	2.08
Resíduo I	5292.1123	18	294.0062	16.3048 %ns
SOLUÇÃO (S)	5583.9248	2	2791.9624	3.06
Interação TxS	648.6835	2	324.3418	0.36
Resíduo II	32860.1641	36	912.7823	29.1689 %ns
Variação total	44997.7500	59		

ns - não significativo estatisticamente.

A Tabela 44 de resumo da análise de variância demonstrou não haver diferença estatisticamente significativa sobre a microdureza superficial do cimento de ionômero de vidro modificado por resina para os fatores e interações estudadas.

Segue a análise de cada fator e da respectiva interação abaixo.

a) FATOR TEMPO

Foi construída a tabela de médias para o fator Tempo, isoladamente, bem como o gráfico, apresentados a seguir (Tabela 45, gráfico 23). A análise de variância demonstrou não haver diferença estatisticamente significativa para este fator sobre a microdureza superficial do Cimento de Ionômero de vidro modificado por resina.

Tabela 45 - Médias de microdureza superficial (KN) Cimento de Ionômero de vidro modificado por resina para o fator Tempo.

Inicial (T0)	14 dias (T1)
60,02	66,42

* ns

Dp.: $\pm 3,13$

Gráfico 23 - Médias de microdureza superficial (KN) do ionômero de vidro modificado por resina para o fator Tempo.

b) FATOR SOLUÇÃO

A análise do fator Solução para a microdureza superficial do Cimento de Ionômero de vidro modificado por resina demonstrou que este fator isoladamente não teve efeito estatisticamente significativo sobre essa variável (tabela 46 e gráfico 24.).

Tabela 46 - Médias de microdureza superficial (KN) do ionômero de vidro modificado por resina para o fator Solução.

Controle	Solução a base de óleo essencial de <i>Casearia sylvestris</i>	Clorexidina
71,91	67,98	49,77

*ns

Dp.: $\pm 6,75$

Gráfico 24 - Médias de microdureza superficial (KN) do ionômero de vidro modificado por resina para o fator Solução.

c) INTERAÇÃO TEMPO X SOLUÇÃO

Na Tabela 47 e no gráfico 25 constam as médias de microdureza superficial do Cimento de Ionômero de vidro modificado por resina para a interação Tempo x Solução, que não determinou significância estatística.

Tabela 47 - Médias de microdureza superficial (KN) do ionômero de vidro modificado por resina para interação Tempo x Solução.

	T0 (inicial)	T1 (14 dias)
Controle	73,23	70,60
Solução a base de óleo essencial de <i>Casearia sylvestris</i>	63,51	72,45
CHX	43,34	56,20

*ns

Dp. $\pm$ 9,55 **Gráfico 25** - Médias de Microdureza Superficial do ionômero de vidro modificado por resina para a interação Tempo x Solução.

5.11 Microscopia Eletrônica De Varredura (MEV)

A seguir são apresentadas algumas fotomicrografias ilustrando a qualidade superficial da amostra do controle e suas similares submetidas aos diferentes enxaguatórios bucais (Figuras 33, 34, 35, 36, 37, 38).

5.11.1 Resina composta

Figura 33- Fotomicrografia da superfície da Resina Composta do grupo controle (submetido à água destilada). A- aumento de 100 X, B- aumento de 1000 X e C- aumento de 10000 X.

Figura 34- Fotomicrografia da superfície da Resina Composta do grupo submetido ao enxaguatório de *Casearia Sylvestris*. A- aumento de 100 X, B- aumento de 1000 X e C- aumento de 10000 X.

Figura 35- Fotomicrografia da superfície da Resina Composta do grupo submetido à Clorexidina 0,12%. A- aumento de 100 X, B- aumento de 1000 X e C- aumento de 10000 X.

5.11.2 Cimento de Ionômero de Vidro Modificado por Resina

Figura 36- Fotomicrografia da superfície do Cimento de Ionômero de Vidro Modificado por Resina do grupo controle (submetido à água destilada). A- aumento de 100 X, B- aumento de 1000 X e C- aumento de 10000 X.

Figura 37- Fotomicrografia da superfície do Cimento de Ionômero de Vidro Modificado por Resina do enxaguatório de *Casearia Sylvestris*. A- aumento de 100 X, B- aumento de 1000 X e C- aumento de 10000 X.

Figura 38 - Fotomicrografia da superfície da Resina Composta do grupo submetido à Clorexidina 0,12%. A- aumento de 100 X, B- aumento de 1000 X e C- aumento de 10000 X.

Discussão

6 DISCUSSÃO

A necessidade de aprimoramento na indústria farmacêutica tanto no setor médico como odontológico, vem impulsionando novas pesquisas no intuito de desenvolver produtos eficazes e com o mínimo de efeitos colaterais. Considerando essa vertente de desenvolvimento, cada vez mais o mercado fitoterápico vem tomando destaque neste campo, haja vista o caso brasileiro, no qual, estima-se um crescimento no mercado de fitoterápicos de 5% ao ano, enquanto o crescimento para os produtos sintéticos gira em torno de 3 a 4% (REIS; MARIOT; STEENBOCK, 2004).

Assim, a flora brasileira ainda pode ser mais bem estudada e explorada, tanto no descobrimento de novas substâncias com potencial terapêutico, quanto na elucidação de inúmeras substâncias que são utilizadas pela população sem o conhecimento de suas propriedades, efeitos farmacológicos e tóxicos (TAVARES, 1996). Não somente a flora brasileira deve ser estudada, mas sim a flora mundial, pois das, aproximadamente, 500.000 espécies de plantas superiores do planeta, apenas cerca de 5 a 15% têm sido estudadas na busca de substâncias biologicamente ativas (BUSKÜHL, 2007), o que justifica o empenho na busca de novos produtos odontológicos, com princípios ativos oriundos de plantas medicinais.

6.1 Obtenção do óleo essencial

A quantidade de óleo essencial obtida no processo de extração das folhas secas coletadas no mês de agosto foi 0,85mL/100g folhas secas, sendo que essa quantidade pode variar, bem como a composição do óleo dependendo da época da colheita (SPANDRE, 2010).

A composição do óleo essencial depende do estágio de desenvolvimento da planta, como também dos micronutrientes fornecidos, qualidade do solo, temperatura e também, há descrição na literatura, de que ocorre variabilidade sazonal na produção de óleo essencial, sendo a melhor época de coleta, com referência ao rendimento, o final do outono (SPANDRE, 2010).

O óleo essencial extraído a partir das folhas, por meio do aparelho de Clevenger, foi testado, uma vez que na literatura há descrição de atividade promissora na atenuação de

processos inflamatórios (ESTEVES et al., 2005; RUPPELT et al., 1991; BASILE et al., 1990) e antimicrobianos (SCHNEIDER et al. 2006).

6.2 Análise do óleo essencial por cromatografia a gás acoplada à espectrometria de massas

Foi realizada a análise por cromatografia a gás acoplada à espectrometria de massas para identificar os possíveis compostos presentes que poderiam ser os responsáveis pela atividades farmacológicas descritas para a espécie. Os espectros de massas forneceram os pesos moleculares e o perfil de fragmentação de cada componente. Assim, por comparação dos dados obtidos com os da biblioteca Wiley foi possível identificar os constituintes majoritários.

Os óleos essenciais são compostos complexos, produzidos como metabólitos secundários de algumas plantas. Geralmente, os componentes em maior porcentagem determinam as propriedades biológicas dos mesmos (CROTEAU et al., 2000).

Os resultados do presente estudo foram qualitativamente semelhantes aos de outros da literatura, identificando-se cerca de 25 constituintes, sendo predominante a presença de germacreno D, biciclogermacreno, δ -cadinene, espatulenol, óxido de cariofileno e β -cariofileno, porém com teores diferentes (SPANDRE, 2010; ESTEVES et al., 2005; SILVA et al., 2004).

A maior parte dos componentes identificados pertence ao grupo dos sesquiterpenos, como o biciclogermacreno, germacrenos D, óxido de cariofileno e β -cariofileno, e são definidos na bibliografia como anti-inflamatórios, anti-edêmicos, antitumorais, antialérgicos, bactericidas e repelentes (ESTEVES et al. 2005; FORMISANO et al., 2006). A presença de β e δ -elemeno pode estar associada às propriedades anticancerígenas descritas para a espécie (SPANDRE, 2010).

6.3 Avaliação da atividade antimicrobiana do óleo essencial e do enxaguatório a base de óleo essencial de *Casearia sylvestris*

A descoberta de princípios ativos de plantas com atividade antimicrobiana sobre a microbiota bucal, poderá levar à novas terapias bem como às terapias opcionais ao cirurgião-dentista (WECKWERTH et al., 2008). Assim, o óleo essencial, foi submetido à avaliação da atividade antimicrobiana frente aos micro-organismos causadores da cárie dental.

O método de microdiluição é utilizado para determinar a concentração inibitória mínima (CIM), ou seja, a concentração mínima necessária para inibir um micro-organismo, de forma eficiente, para medir quantitativamente a atividade *in vitro* de um agente antimicrobiano contra um determinado micro-organismo isolado (ALVES et al., 2008). Essa técnica a melhor opção considerada por Alves et al. (2008) para avaliação da atividade antibacteriana de produtos naturais.

Os valores de CIM foram determinados pela leitura visual após a revelação com resazurina, que é um indicador de óxido-redução, de cor azul, que se oxida na presença de células viáveis a resofurina, que é de cor vermelha (STOPPA et al. 2009) .

O que é conhecido como CBM representa a concentração bactericida mínima, que significa a quantidade de agente necessário para matar um micro-organismo isolado (CARVALHO, 2009). Este experimento é realizado em ágar sangue, com leitura visual dos resultados, observando ou não halos de colônias bacterianas formadas.

O controle preconizado na literatura (CUNHA et al., 2007; CARVALHO, 2009) frente a bactérias bucais, para a validação da técnica é o dicloridrato de clorexidina, o qual foi utilizado como antibiótico padrão neste estudo.

Os ensaios para o óleo essencial foram realizados em uma faixa de concentração que variou de 0,004 a 400 µg/mL. Valores abaixo de 400µg/mL representam na literatura bons valores de atividade antimicrobiana, sendo que valores abaixo de 100µg/mL para extratos e abaixo de 10 µg/mL para substâncias puras são considerados promissores (RÍOS e RECIO 2005).

O óleo essencial apresentou valores de CIM para o *S. mutans* (ATCC) de 25µg/mL, para *S. mitis* (ATCC) de 100µg/mL, *S. salivaris* (ATCC) de 100µg/mL, *S. sanguinis* de 100µg/mL, no entanto, não apresentou atividade antibacteriana nas concentrações testadas para *E. faecalis* (ATCC). Assim, *C. sylvestris* coletada no mês de agosto forneceu óleo essencial com valores de concentração inibitória e bactericida mínima promissores para o

desenvolvimento de formulações com ação antimicrobiana, com base no estudo de RÍOS e RECIO (2005).

Não foram encontrados estudos na literatura referente à atividade antimicrobiana do óleo essencial de *Casearia sylvestris* frente à maioria dos micro-organismos estudados neste trabalho, apenas encontrou-se a atividade antibacteriana do óleo essencial (SCHNEIDER et al., 2006) e do extrato obtido com propilenoglicol para *E. faecalis* (WECKWERTHD et al., 2008) e do extrato etanólico para *S. mutans* e *L. casei* (TAVARES et al., 2008).

Schneider et al. em 2006 avaliaram a atividade do óleo de *Casearia sylvestris* frente ao *E. faecalis* e obtiveram atividade antimicrobiana para este, o que não está em acordo com o presente estudo. Esta diferença encontrada pode ser devido à diferença no meio de cultura dos dois experimentos, sendo que o meio utilizado no presente estudo foi o TSB (Tryptona de soja) que é um meio mais rico em nutrientes em sua composição do que o Müeller-Hinton, meio utilizado por Schneider et al. (2006).

Outro fator que pode influenciar é a composição do óleo essencial, que conforme já descrito a cima, pode variar de acordo com a sazonalidade. No presente estudo, o óleo foi obtido no mês de agosto, que corresponde ao inverno no hemisfério sul, enquanto que o estudo de Schneider et al. (2006) foi realizado em dezembro (verão – hemisfério sul). As temperaturas baixas têm influencia significativa nos níveis de metabólitos secundários (GOBBO-NETO e LOPES, 2007; SPANDRE 2010), além disso, as condições de coleta, estabilização e estocagem, podem ter grande influência na qualidade, logo, no valor terapêutico de preparados fitoterápicos (GOBBO-NETO e LOPES, 2007). Spandre em 2010 relatou que outro fator importante a se considerar é a fase fenólica da planta, pois segundo, Carvalho (2007), na fase da floração os constituintes majoritários são influenciados pelos agentes polinizadores (abelhas do gênero *Melipona* e diterpenos sirfídeos), e na fase vegetativa por patógenos e herbívoros. O fotoperíodo também influencia na dinâmica metabólica, inferindo a menor quantidade de luz e da temperatura do outono e inverno na variação dos rearranjos dos diterpenos presentes no óleo (SPANDRE, 2010), enquanto que as épocas com menor produção e conteúdo de metabólitos de interesse são o final da primavera e do verão. (SPANDRE, 2010).

Weckwerthd et al. 2008 compararam a atividade antimicrobiana *in vitro* de diferentes antibióticos e extratos hidroalcoólicos e infusão de *Casearia sylvestris* Swart frente as linhagens de *Enterococcus faecalis* da cavidade oral e verificaram que o extrato obtido com propilenoglicol apresentou maior atividade sobre as linhagens de *E. faecalis* isoladas,

enquanto que poucas linhagens mostraram-se sensíveis aos outros extratos obtidos em álcool etílico, de cereais e mistura hidroalcoólica.

Tavares et al. (2008) avaliaram a atividade antimicrobiana do extrato etanólico de *Casearia sylvestris* contra *S. mutans* e *L. casei* e verificaram sensibilidade deste micro-organismos, sugerindo, desta forma o extrato etanólico da *Casearia sylvestris* como alternativa no tratamento de condições infecciosas da cavidade bucal, o que também é verificado no presente estudo para o óleo essencial desta planta.

Também no presente estudo, a clorexidina demonstrou bom efeito sobre os micro-organismos testados, o que é confirmado pelos achados de Weckwerth et al. (2008). Uma possível explicação para essa boa ação está no fato da clorexidina atuar na desorganização geral da membrana celular bacteriana e na inibição de enzimas da membrana (TORRES et al., 2000). No entanto, a utilização regular de produtos para higiene bucal contendo este agente químico está frequentemente associada ao manchamento de dentes e restaurações (GODOI et al., 2010), à alterações no paladar, e a uma sensação de queimação na ponta da língua (SOUZA et al., 2011).

Desta forma, verificou-se que o óleo essencial de *Casearia sylvestris* apresenta atividade antimicrobiana promissora para o desenvolvimento de novo enxaguatório bucal cujo princípio ativo seja ele. Assim, foi desenvolvido um enxaguatório bucal experimental cujo princípio ativo é o óleo essencial da *Casearia sylvestris*.

Esse enxaguatório foi também avaliado contra micro-organismos utilizados para o ensaio antimicrobiano do óleo, e comparado à clorexidina (padrão ouro), ao enxaguatório sem o óleo essencial de *Casearia sylvestris* e ao Listerine. Para este teste consideram-se os diferentes enxaguatórios na sua concentração disponível (puro) como sendo 100% (FLEMINGSON et al., 2008). Essa concentração foi a inicial e, em seguida, foram feitas sucessivas diluições obtendo-se as concentrações de: 50%, 25%, 12,5%, 6,25%, 3,12%, 1,56%, 0,78%, 0,39%, 0,19%, 0,09% e 0,04%.

O enxaguatório com o óleo essencial apresentou atividade antimicrobiana considerável, visto que a ação bactericida e bacteriostática frente a *S. mutans* ocorreu após várias diluições na concentração de 0,19% em relação ao produto puro, o que corresponde a 2,5 µg/mL de óleo essencial.

A fim de comparação, para verificar se a formulação sem o óleo essencial de *Casearia sylvestris* também apresentava atividade antimicrobiana, a mesma foi testada e verificou-se que ela também apresenta atividade antimicrobiana, no entanto, essa atividade é potencializada com o acréscimo do óleo essencial. A inibição e morte das bactérias com o

enxaguatório sem o óleo essencial ocorreu com a concentração de 0,78% em relação ao produto puro, passando a atividade a uma concentração de 0,19% com o acréscimo do óleo essencial em estudo.

Devido ao fato do Listerine ser a base de óleo essencial realizaram-se os testes antimicrobianos e citotóxicos dele também, para que fosse possível a comparação do enxaguatório à base de óleo essencial de *Casearia sylvestris* com um antisséptico já consagrado no mercado. Assim, foi possível observar que a atividade antimicrobiana do Listerine é menor que a atividade do enxaguatório à base de óleo essencial de *Casearia sylvestris* para todos os micro-organismos testados.

Para complementar os ensaios antimicrobianos para determinação dos valores de CIM e CBM foi realizado o ensaio denominado curva de morte que analisa a cinética de ação dos agentes testados sobre o micro-organismo avaliado (MAGALHÃES, 2010), no caso desta pesquisa o *S. mutans*.

Neste ensaio, utilizou-se *S. mutans* como micro-organismo iniciador, pois este é responsável pelo início do processo de cárie e, assim, é considerado um dos principais micro-organismos cariogênicos (SOUZA et al. 2011). Com esse ensaio pode-se constatar que o enxaguatório à base de óleo essencial de *Casearia sylvestris* e o Listerine foram capazes de ocasionar a total eliminação de micro-organismos viáveis apenas após 24 horas de contato. Cabe ressaltar que a concentração de óleo essencial de *Casearia sylvestris* na formulação desenvolvida está muito abaixo de 4000 ug/mL, concentração não citotóxica, sendo esta a concentração máxima avaliada nos ensaios de citotoxicidade. O conhecimento deste fato assegura a possibilidade de desenvolvimento de formulação contendo óleo essencial de *Casearia sylvestris* em maior concentração, o que poderá propiciar efeito bactericida em menor tempo.

6.4 Análise da citotoxicidade do óleo essencial e do enxaguatório a base de óleo essencial de *Casearia sylvestris*

Os enxaguatórios bucais atualmente são utilizados como forma complementar na higienização bucal, com a finalidade de auxiliar os métodos convencionais de higiene (PITHON et al., 2011). Eles podem atuar de duas formas principais, sendo profilaticamente ou de forma terapêutica. No primeiro caso, eles evitam que ocorra um desequilíbrio da

microbiota quando os métodos mecânicos são ineficientes, já no segundo caso, eles visam atingir as bactérias relacionadas às doenças, com o intuito de reequilibrar a microbiota bucal (MARSH, 1992).

Os agentes em questão apresentam distintos ingredientes ativos, dentre eles estão os óleos essenciais, a clorexidina e o cloreto de cetilpiridíneo, tratando-se de uma mistura de componente ativo, água, álcool, surfactantes, umectantes e flavorizantes (THYLSTRUP e FEJERSKOK, 1995).

No entanto, alguns destes componentes ativos, podem apresentar alguns efeitos colaterais (PITHON et al. 2011). Assim, um dos principais desafios nesta área, é desenvolver e selecionar substâncias biocompatíveis (JORGE et al., 2004).

Neste intuito, a toxicidade é um dos parâmetros crucial para a avaliação de resposta biológica e do potencial lesivo que pode causar a morte de células ou de tecidos, sendo hoje o primeiro teste de escolha usado para quase todas as novas substâncias (SIQUEIRA, et al., 2008). Além disso, experimentos com fibroblastos de camundongos da linhagem L929, são recomendados pela ISO 10993-5 (BUSKÜHL, 2007, ANVISA). Diante disso, neste estudo, a citotoxicidade nas células L929 foi determinada pelo teste MTT que é considerado um índice sensível para avaliar a citotoxicidade de materiais dentários (MOSSMAN, 1983; ZHANG et al., 2003). O teste é um dos métodos mais comumente usado para avaliar a citotoxicidade de medicamentos, antissépticos orais e produtos contendo peróxido (ZHANG et al., 2003). No experimento com MTT, o sal de Tetrazólio é convertido em sal de Formazan pelas enzimas mitocondriais (desidrogenase succínica) das células vivas, formando uma coloração azulada (MOSSMAN, 1983, VITRAL et al., 2008). A quantidade de Formazan gerado é diretamente proporcional ao número de células viáveis (população homogênea) (VITRAL et al., 2008).

Assim, avaliou-se no presente estudo a citotoxicidade em diferentes tempos e concentrações do óleo essencial comparado a Clorexidina pelo método MTT, bem como do enxaguatório experimental comparando-o a Clorexidina e ao Listerine; logo, verificou-se no estudo, que a toxicidade celular do óleo essencial de *Casearia sylvestris* está diretamente relacionada ao tempo de exposição, bem como para a Clorexidina, o que está de acordo com os estudos de Hidalgo e Dominguez (2001), Gianneli et al. (2008) e Lee et al. 2010 que afirmaram que o mecanismo de citotoxicidade da clorexidina é tempo, frequência e concentração dependentes (LEE et al., 2010), embora o efeito sobre fibroblastos gengivais sejam rápidos, ou seja, o prejuízo aos fibroblastos são praticamente iguais em curtos e longos períodos de exposição (FLEMINGSON et al., 2008).

A citotoxicidade da Clorexidina é amplamente estudada (GIANNELI et al., 2008, FARIA et al., 2009; HIDALGO e DOMINGUEZ, 2001; PUCHER e DANIEL, 1993; MARIOTTI e RUMPF, 1999; LEE et al., 2010) e segundo, Lee et al. (2010) ela é um agente citotóxico e a citotoxicidade dela não é para tipos celulares específicos. Esses mesmos autores estudaram a citotoxicidade e a síntese de colágeno sobre as células U2OS (células osteoblásticas) e, verificaram que a clorexidina inibiu o crescimento e proliferação celular, além de inibir a síntese de colágeno (LEE et al., 2010; MARIOTTI e RUMPF, 1999). Esses fatores, tem um importante papel na cicatrização de feridas, assim, os achados dos estudos de Lee et al. (2010) podem justificar o seu efeito prejudicial no potencial reparador e regenerativo de tecidos periapicais.

A toxicidade da Clorexidina em 30 minutos em fibroblastos equinos foi estudada por Redding and Booth em 1991, os quais demonstraram que a mesma é tóxica neste período de tempo, assim como no presente estudo. Essa toxicidade se dá pelo fato da clorexidina ser capaz de: 1) causar alterações na montagem Actínica citoesquelética, 2) estimular a Apoptose e morte celular autofágica/necrótica e, 3) alterar o potencial de membrana mitocondrial, induzindo a depleção de ATP intracelular (GIANNELLI et al., 2008).

Assim, a clorexidina é extremamente citotóxica (pro-apoptótica e pró-necrótica) para diferentes tipos celulares *in vitro*, envolvendo distúrbio de função mitocondrial, aumento intracelular de Ca^{2+} , e estresse oxidativo (GIANNELLI et al., 2008). Isso pode sugerir que a sua aplicação direta durante a terapia regeneradora para o tratamento de doenças periodontal e peri-implantar pode ter efeitos tóxicos sérios sobre os fibroblastos gengivais, células endoteliais e, especialmente, sobre osteoblastos alveolar, assim, interferindo negativamente com a fase de cura desta doença (GIANNELLI et al. 2008), o que justifica a busca por novos enxaguatórios bucais que apresentem menos efeitos colaterais que a clorexidina.

Faria et al. em 2009, também verificaram por meio da microscopia eletrônica de transmissão que o tratamento de células L929 com clorexidina causa morte celular por apoptose e necrose via estresse retículo endoplasmático. A necrose celular é uma forma passiva de morte celular, resultado da destruição da membrana celular e liberação do componente da célula para o meio extracelular (MANTELLINI et al., 2003), enquanto que apoptose, é uma forma ativa de morte celular, e é caracterizada por encolhimento e condensação da cromatina nuclear seguida por fragmentação nuclear (TRUMP et al., 1997; FARIA et al., 2009).

A metodologia normalmente utilizada para avaliar citotoxicidade com MTT utiliza a exposição das células por 24 horas aos agentes em estudo. Assim no presente estudo quando avaliado o período de 24 horas tanto a clorexidina quanto o óleo essencial de *Casearia*

sylvestris foram citotóxicos. No entanto, diante do fato de que o período, indicado pelos cirurgiões-dentistas, para que os pacientes mantenham-se sem ingerir alimentos após a utilização de enxaguatórios bucais por 30 minutos, realizou-se, também, o experimento com o tempo de 30 minutos de exposição, e constatou-se que a porcentagem de viabilidade celular quando submetido às diferentes concentrações de óleo essencial da *Casearia sylvestris* é maior quando analisado em 30 minutos do que em 24 horas. Comportamento este semelhante ao da clorexidina, embora a porcentagem de viabilidade seja bem mais baixa que a do óleo essencial de *Casearia sylvestris*, o que a torna muito citotóxica.

Também se verificou no presente estudo que não houve diferença estatisticamente significativa para a maioria das concentrações de óleo essencial testadas. Este fato nos permitiu uma liberdade de escolha ampla no desenvolvimento do enxaguatório bucal.

Na literatura, não foram encontrados relatos sobre a citotoxicidade do óleo essencial de *Casearia Sylvestris* frente a fibroblastos gengivais. A ação tóxica de *Casearia Sylvestris* foi estudada frente a células tumorais HT29, A549, MDA-MB-231 (GUIL-GUERRERO et al., 2009) MOLT-4, MDA-MB-435, HCT-8, SF-295 (DOS SANTOS et al., 2010) e mostraram ser tóxicas para as células em questão, o que possivelmente seja pela presença de grupos sesquiprtenos, no primeiro caso (GUIL-GUERRERO et al., 2009). Por isso, a mesma foi considerada promissora para programa de triagem citotóxica (GUIL-GUERRERO et al., 2009). Para os fibroblastos L929 dos Santos et al. em 2010 verificaram que os componentes diterpênicos isolados do extrato etanólico (EtOH) de *Casearia sylvestris* são menos tóxicos para essas células que para as células tumorais, o que mostra sua toxicidade seletiva.

O enxaguatório experimental foi testado também quanto à citotoxicidade, para verificar se a mistura utilizada na formulação associada ao óleo essencial, poderia agir negativamente nas células, indicando um potencial tóxico para a formulação. Para o enxaguatório bucal testado, verificou-se uma menor toxicidade do que para a clorexidina e para o Listerine. A média para o enxaguatório experimental foi de 63,28% de células viáveis, havendo morte de aproximadamente de 36,72% de células. O que comprova a assertiva de Vitral et al. (2008), que afirmam que poucos materiais odontológicos, ou talvez nenhum, são totalmente inertes do ponto de vista fisiológico, pois contém uma variedade de componentes com potencialidades tóxicas ou irritantes.

O Listerine foi testado, pelo mesmo motivo já explanado no experimento antimicrobiano. Esse enxaguatório já consagrado no mercado mostrou-se citotóxico, no entanto, estatisticamente menos que a clorexidina 0,12%, o que está de acordo com os estudo de Flemingson et al. (2008), que demonstraram que o Listerine puro foi menos citotóxico que a clorexidina.

A citotoxicidade é um fenômeno complexo *in vivo*, o qual pode resultar em um amplo espectro de efeitos, desde a morte celular até aberrações metabólicas. Assim, a cultura de células representa o estágio inicial de investigação de um material de uso odontológico (BUSKÜHL, 2007). Os métodos utilizados para cultura celular são reprodutíveis, sensíveis, de baixo custo e por se tratar de um estudo *in vitro* minimizam as variáveis (BUSKÜHL, 2007). Mas, por se tratar de um teste preliminar, ele nos impossibilita dizer que um material é biocompatível ou não, apenas com ensaios de toxicidade celular, apesar do mérito deste teste (VITRAL et al., 2008). Pois, um resultado negativo indicará que o material estará livre de produtos prejudiciais ou que sua quantidade é insuficiente para causar efeitos agudos em células isoladas do corpo. Por outro lado, um teste de citotoxicidade positivo pode ser um sinal que o material contém uma ou mais substâncias lixiviáveis que podem apresentar importância clínica (VITRAL et al., 2008). É importante ressaltar que os resultados obtidos podem não ser exatamente os mesmos da clínica, já que não é levada em conta a dinâmica tecidual (BUSKÜHL, 2007). No entanto, é seguro afirmar que um material que demonstre alta toxicidade celular, muito provavelmente será tóxico aos tecidos vivos.

Considerando o debate, cada vez mais enfático, sobre a ética na utilização de animais em laboratório para testes de substâncias (ANVISA), os testes *in vitro* deveriam sempre preceder os testes *in vivo* (ROGERO et al., 2003).

A biocompatibilidade de materiais dentários é especialmente relevante porque os profissionais da odontologia utilizam materiais que permanecem por longos períodos em contato com organismos vivos. Não existem materiais 100% seguros; então a decisão sobre o uso destes materiais deve ser equilibrada nos potenciais riscos e benefícios determinados pelo profissional e se os possíveis benefícios se sobrepõem sobremaneira aos possíveis riscos (VITRAL et al. 2008).

6.5 Formulação do enxaguatório a base de óleo essencial de *Casearia sylvestris*

Para a confecção da formulação, realizou-se uma revisão de literatura, e durante essa, pode-se observar a falta de metodologia industrial na hora de formular um produto. Muitos deles apenas abordavam uma formulação simples, sem considerar comportamentos oxidativos ou características físico-químicas das substâncias.

Apesar de muitas vezes conseguirem resultados positivos quanto à atividade antimicrobiana contra *S. mutans* (GARCIA et. al., 2011; SANTOS et. al., 2010; ZANIN, 2007, FILHO et. al., 1998), percebe-se que, infelizmente, não foram avaliados fatores de citotoxicidade dos mesmos ou se houve alterações dos dentes e materiais restauradores, o que é consideravelmente importante comercialmente e cientificamente.

Para um agente antimicrobiano ser empregado em um enxaguatório bucal, ele deve ser seguro (atóxico na concentração usada); não induzir a alergias; ter sabor agradável; de fácil manipulação; eficácia; especificidade para a microbiota bucal e boa substantividade (VAN DER OUDERAA, 1991).

No Brasil, qualquer produto, antes de ser comercializado, deve ser analisado e aprovado pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). Enxaguatórios bucais são classificados como cosméticos, no item de higiene pessoal. Foi utilizada a menor variedade possível de matérias-primas não orgânicas assim como a concentração mínima necessária. Não foram utilizados o triclosan ou compostos fluorados como ativos do enxaguatório para que o produto se enquadrasse como Grau de Risco 1 sendo necessária apenas sua notificação para ser produzido (RDC 343, de 13 de dezembro de 2005).

Desta forma, a primeira etapa para se formular foi procurar na legislação todos os excipientes permitidos ao uso e sua concentração mínima e máxima. Essa legislação pode ser encontrada no seguinte site: www.anvisa.gov.br/cosmeticos/index.htm.

Alcoóis, especialmente o etanol, são agentes químicos comumente usados na dissolução de outras substâncias que compõem os enxaguatórios bucais. A preferência de um enxaguatório bucal sem etanol em sua formulação foi devido aos efeitos colaterais associados a este produto (ressecamento e desidratação na mucosa bucal) e ardência na boca, o que diminui a adesão dos pacientes ao uso de tais enxaguantes (REIS et al., 2002; FREITAS et al., 2005; PELAÉZ et al, 2004).

Outro fator importante considerado para o enxaguatório bucal foi o valor de pH que, se menor que 5,0, pode acarretar a desmineralização dos dentes e se, maior que 7,0, favorece a proliferação de micro-organismos cariogênicos (LIMA et al., 2005).

Assim, a seguir se encontra a justificativa do uso dos componentes da formulação:

ÓLEO ESSENCIAL: O óleo essencial usados possui atividade antimicrobiana, conforme aponta os resultados deste estudo, sendo esse o princípio ativo principal do produto proposto nesta pesquisa.

PHENOVA: Conservante na forma líquida que contém metil, etil, propil, e butil parabenos mais fenoxietanol, possui um amplo alcance de ação anti-microbiana contra as

bactérias Gram-negativas, Gram-positivas, leveduras e fungos na maioria dos sistemas. As maiores vantagens de Phenova, em relação aos demais conservantes, são as seguintes: compatibilidade tanto com sistemas catiônicos como aniônicos, manutenção da ação antimicrobiana independente do pH final do produto, não afeta a cor e o cheiro do produto acabado, conserva com sucesso formulações contendo proteínas, facilidade de manipulação e baixa toxicidade nas concentrações usuais (Site oficial do fornecedor do produto – CRODA).

COCAMIDOPROPIL BETAÍNA: é o surfactante anfótero mais utilizado pela indústria de cosméticos (OLIVEIRA et al., 2005). É derivado da conjugação de ácidos graxos do coco com a aminopropil betaína. O fato desta substância ser anfótera permite seu uso com maior segurança, por ser mais suaves. Esse surfactante foi introduzido na década de 1970 e progressivamente vem substituindo o lauril sulfato de sódio, dentre outros surfactantes, devido ao seu baixo potencial irritativo (BÁRÁNY et al., 1999, OLIVEIRA et al., 2005)

BHT: É usado como um antioxidante em cosméticos, alimentos e produtos farmacêuticos. É principalmente usado para prevenir a oxidação de ácidos graxos e óleos e a prevenção da perda de atividade dos mesmos (ROWE et al., 2006). O BHT tem efeito contra vírus, tendo sido estudado por Freeman et al. (1985), contra o vírus do herpes simplex labial. Segundo esse mesmo autor o BHT incorpora-se na membrana, perturbando a geometria da bicamada lipídica.

EDTA: É um quelante amplamente usado em preparações farmacêuticas, incluindo enxaguatórios bucais, soluções oftálmicas e preparações tópicas (ROWE et al., 2006).

ÁCIDO CÍTRICO: Agente acidificante; tampão (ROWE et al., 2006);

CITRATO DE SÓDIO: Agente alcalinizante, tampão; (ROWE et al., 2006);

Devido ao fato de que alguns enxaguatórios à base de óleos essenciais apresentam pH inferior a 5,5, existe a preocupação de que estes possam acarretar em erosão dentária. Uma vez que o pH 5,5 é considerado crítico para o desenvolvimento da erosão, teoricamente, o efeito da desmineralização vai depender da frequência da exposição e do tempo em que o pH permanece inferior a 5,5. Dessa forma, procuraram-se substâncias que possuíssem um intervalo tamponante entre 5,5-6,5, para se adequar às necessidades e não ser um potencial causador de erosão dentária (TOLENTINO et al., 2010; CLAFFEY et al., 2003; PONTEFRACCT et al., 2001; PRETTY et al., 2003).

SORBITOL: Sorbitol é amplamente usado como um excipiente farmacêutico. Tal substância tem sabor refrescante e doce, sem possuir açúcar, o que é interessante para pacientes diabéticos. (ROWE et al., 2006);

SACARINA SÓDICA: é muito utilizada como um adoçante em dentifrícios, alimentos, bebidas, na indústria farmacêutica, para manter a qualidade, características e segurança dos produtos (REID et al., 2007)

Tween 20 (polissorbato): é um agente dispersante, emulsionante, tensoativo não-iônico, solubilizante, agente de suspensão e umectante. É amplamente utilizado na indústria de cosméticos e alimentícia (ROWE et al., 2009).

6.6 Análise dos materiais restauradores odontológicos submetidos ao enxaguatório experimental a base de óleo essencial de *Casearia sylvestris*

A demanda estética, atualmente observada na população tem exigido aprimoramento de técnicas e materiais odontológicos para suprir essa necessidade populacional. No entanto, os materiais restauradores odontológicos disponíveis no mercado, ainda sofrem alterações nas suas propriedades físicas, químicas e mecânicas frente a algumas condições da cavidade oral como por exemplo, o consumo de bebidas com pigmentos (GODOI et al., 2010) e o uso de enxaguatórios bucais (TRAUTH et al., 2012).

6.6.1 Alteração de cor

A alteração de cor e, seu efeito na translucidez é ainda hoje, uma desvantagem das resinas compostas (SCHULZE et al., 2003; FREITAS et al. 2006) e dos ionômeros de vidro modificados por resina (MANEENUT et al., 1995) pois é promovida por fatores intrínsecos, causados pela oxidação do ativador químico (FREITAS et al., 2006) e/ ou extrínsecos do material (FREITAS et al., 2006), que modificam a cor dos compósitos por manchamento, que segundo Dinelli et al. (1996), Schulze et al. (2003), Freitas et al. (2006), pode ser causado por absorção ou adsorção de corantes advindos de fontes externas. Tendo em vista a importância deste aspecto, vários aparelhos foram desenvolvidos para análise da alteração de cor (FREITAS, 2006). Um destes aparelhos utiliza a espectrofotometria que é um método prático para este fim e reconhecido pela literatura, pois possibilita quantificar numericamente a cor dos objetos e compará-los a uma referência padrão, o que permite medir a alteração de cor e

de luminosidade, principalmente, para controlar a qualidade estética das restaurações (SCHULZE et al., 2003, FREITAS, 2006).

Um dado importante presente na literatura é a consideração sobre o que realmente é uma alteração significativa de cor. De acordo com o sistema CIE $L^*a^*b^*$, as alterações de cor entre 0,0 e 0,5 são consideradas como vestígio, de 0,5 a 1,5 como superficiais, de 1,5 a 3,0 perceptíveis (ANIL et al., 1999) e que valores maiores que 3,3 são clinicamente inaceitáveis (RUYTER et al., 1987; ANIL et al., 1999, FREITAS et al., 2006). Tendo por base estes conceitos, os resultados deste estudo demonstraram que a resina composta Z250 apresentou alteração de cor superficial quando submetida à CHX (1,04) e água destilada (1,29) enquanto que para a condição de submissão a *Casearia sylvestris* (1,73) determinou alteração de cor perceptível. Já para o Ionômero de vidro modificado por resina não houve diferença estatisticamente significativa na cor deste material, depois de submetidos às diferentes soluções.

Para a resina composta, o grupo de corpos de prova imersos em água destilada apresentou média de alteração de cor estatisticamente igual ao grupo imerso em clorexidina 0,12%, tal fato se deve, provavelmente, a quantidade de água presente no enxaguatório (LEE et al., 2005) e/ou ao tempo de exposição, pois se sabe que a alteração de cor também é influenciada pelo tempo (GODOI et al., 2010). Esses achados, no que se refere à clorexidina, estão de acordo com os estudos de Freitas et al. (2006) que verificaram que o antisséptico a base de clorexidina a 0,12% apresenta comportamento semelhante ao controle no período de sete dias.

Já o grupo submetido ao enxaguatório experimental à base de óleo essencial de *Casearia sylvestris* apresentou maior pigmentação no tempo estudado. Para melhor entendimento da alteração de cor, realizou-se também a análise estatística dos parâmetros L^* , a^* e b^* e verificou-se que o tempo foi o responsável pelas alterações encontradas para a resina estudada, visto que o mesmo foi significativo para L^* , a^* e b^* .

Estudos com maior quantidade de dias e em associação a fatores alimentares são necessários para complementar a análise de alteração de cor (ΔE^*), visto que estudos deste mesmo grupo de pesquisa (GODOI et al., 2010) sobre manchamento de resina composta demonstraram que a CHX sem interação com fatores alimentares, mesmo em outros tipos de resina, promovem alterações de cor apenas superficiais, assim como no presente estudo, mas no entanto, quando associada a fatores da dieta, a mesma pode provocar alterações de cor inaceitáveis clinicamente visto que a CHX sendo enxaguatório bucal catiônico pode precipitar na superfície do material restaurador corantes aniônicos contidos em bebidas e comidas (LEARD et al., 1997; LEE e POWER, 2006). Em relação ao ionômero de vidro modificado por

resina não foram encontrados estudos referentes a alterações de cor destes materiais quando submetidos à enxaguatórios bucais.

Assim, o estudo em questão orienta as alterações provocadas pelos enxaguatórios, no entanto, o desenvolvimento de outros estudos com diferentes materiais restauradores, bem como associações com produtos alimentares são de extrema importância para uma melhor elucidação do assunto.

6.6.2 Rugosidade superficial

A análise de rugosidade superficial foi realizada visto que essa propriedade no ambiente bucal é um critério importante para determinar e prever a deterioração clínica de materiais restauradores. Características da superfície das restaurações de resina composta (BRAMBILLA et al., 2012) e cimento de ionômero de vidro (RIOS et al., 2002) são particularmente importantes, porque superfícies ásperas podem ser propensas a uma colonização e maturação do biofilme microbiano mais rápido (BERTOLINI et al., 2010), aumentando assim a inflamação gengival e o risco de recidiva de cárie (AYKENT et al., 2010). Adicionalmente, os produtos originados do metabolismo microbiano deste biofilme podem agir aumentando a rugosidade e diminuindo a resistência mecânica do material (BERTOLINI et al., 2010).

O cimento de ionômero de vidro é muito utilizado na odontologia restauradora, principalmente na odontopediatria, devido às suas boas características, tais como: adesão química ao esmalte e dentina, biocompatibilidade com a polpa e tecidos periodontais (HSE et al., 1999), liberação de flúor, menor contração volumétrica e coeficiente de expansão térmica semelhante ao da estrutura do dente. Porém, a baixa resistência mecânica, a sensibilidade à umidade, e baixa resistência ao desgaste faz com que as restaurações de cimento de ionômero de vidro sejam geralmente menos duráveis (HSE et al., 1999; BERTOLINI et al., 2010). Na tentativa de elaborar um cimento ionomérico com melhores características de trabalho, melhor resistência e estética foi desenvolvido o cimento de ionômero de vidro modificado por resina, um tipo utilizado para os ensaios deste trabalho, visto que por ser mais estético que o ionômero de vidro convencional é utilizado em áreas onde a necessidade estética é maior, como em lesões cervicais por abfração. No entanto, mesmo com as melhores características deste tipo de ionômero de vidro, o mesmo sofreu aumento na rugosidade superficial com o passar do tempo, sendo que a clorexidina determinou

diferença estatisticamente significativa entre os dois tempos estudados, ou seja, a rugosidade superficial do cimento de ionômero de vidro modificado por resina aumentou após 14 dias de imersão na clorexidina 0,12%, assim como no estudo de Sadaghiani, Wilson e Wilson (2007a). Já para a resina composta não houve diferença estatisticamente significativa nem para os fatores analisados isoladamente, nem para a interação entre os fatores, o que concorda com outros estudos deste grupo de pesquisa (GODOI et al. 2010), e discorda do estudo de Festuccia et al. (2012), cujo tempo de imersão foi representativo de 1 ano de utilização diária do enxaguatório, enquanto que no presente estudo foi de 14 dias, por representar a média de tempo indicado no tratamento com clorexidina 0,12%. Períodos maiores de tempo poderiam mostrar diferença significantes na rugosidade superficial da resina composta, o que precisa de estudos complementares para sua análise.

6.6.3 Microdureza superficial

Os enxaguatórios que rotineiramente são utilizados como coadjuvante na higienização bucal, apresentam diversos componentes dentre eles, emulsificantes, ácidos orgânicos, detergentes, corantes e álcool (FESTUCCIA et al., 2012). Alguns destes componentes podem interferir na microdureza superficial, podendo influenciar na adesão entre a matriz resinosa e as partículas inorgânicas, levando a uma menor resistência à abrasão e causando manchamento da matriz resinosa (SCHNEIDER et al., 2008). Por isso foi realizado este estudo de microdureza superficial dos materiais restauradores quando submetidos aos enxaguatórios bucais.

Segundo, Martins (2007), diversos autores empregaram os ensaios de microdureza Vickers, Knoop, Tukon e Wallace com cargas variando entre 10 a 200 gramas e os tempos de 5 a 60 segundos. Neste estudo a dureza Knoop foi utilizada por possuir um penetrador de diamante com forma piramidal de base alongada, que permite a utilização em regiões mais finas, já que para uma mesma carga, a profundidade da impressão Knoop é menor do que a metade da profundidade obtida com a impressão Vickers. Além disso, por possuir diâmetros diferentes, diminui a possibilidade de recuperação elástica. A carga e o tempo devem ser baseados no material a ser testado, por isso, com base em estudos pilotos anteriores, determinou-se a utilização da carga de 50 gramas por 10 segundos para o cimento de ionômero de vidro e 150 gramas por 15 segundo para a resina composta, com o intuito de

obter impressões regulares, sem deformações e de tamanhos compatíveis com o visor do computador. Para ambos os materiais não houve diferença estatisticamente significativa entre os diferentes enxaguatórios bucais aos quais os corpos de prova foram submetidos. Estes achados estão de acordo com os de Festuccia et al. (2012), que estudaram a resina Z250 e, também não encontraram diferença estatisticamente significativa entre o grupo controle e o grupo submetido à clorexidina 0,12%. Verificou-se para ambos os materiais que, apesar de não ser diferente estatisticamente T0 e T1, ambos apresentaram um aumento da microdureza superficial com o decorrer do tempo. Assim, talvez em períodos maiores de avaliação pudessem ser verificadas mudanças estatisticamente significantes na microdureza superficial dos materiais restauradores testados.

6.6.4 Microscopia Eletrônica de Varredura

Com relação à microscopia eletrônica de varredura verificou-se que para a resina composta, a superfície do grupo controle apresentou mais poros que os demais grupos, o que pode significar que os enxaguatórios bucais, promovem um alisamento da superfície da resina composta, que pode ser devido à remoção de carga orgânica e/ou inorgânica da superfície do material. Já para o cimento de ionômero de vidro modificado por resina verificou-se uma degradação superficial da amostra, com aparecimento de fendas, após submissão na clorexidina, que pode justificar o aumento de rugosidade superficial deste material após o tratamento com clorexidina 0,12%, enquanto pode-se verificar também que o enxaguatório a base de *Casearia sylvestris* promove um aplainamento na superfície deste material comparado ao grupo controle, o que é confirmado em valores absolutos pela rugosidade superficial.

Finalmente, deve-se considerar que tanto resultados *in vitro* como *in situ* apresentam limitações para a avaliação do comportamento superficial de compósitos, pois o tempo de ingestão de alimentos ou imersão de produtos e fatores individuais como o biofilme, qualidade e periodicidade de higienização e ação mecânica do sistema estomatognático tem ação direta sobre o comportamento físico – mecânico dos materiais odontológicos, entretanto a realização desses estudos se mostra como uma estratégia importante para esclarecer a suscetibilidade dos materiais restauradores às alterações de superfície, aplicação dos materiais e orientação dos pacientes sobre a melhor maneira de preservar suas restaurações (GODOI, 2009).

Conclusões

7 CONCLUSÕES

De acordo com a metodologia utilizada pode-se concluir que:

- O rendimento de óleo essencial obtido no processo de extração das folhas secas coletadas no mês de agosto está dentro do padrão esperado.
- A utilização de cromatografia a gás acoplada a espectrometria de massas possibilitou a caracterização e determinação dos constituintes majoritários do óleo essencial.
- O óleo essencial de *Casearia sylvestris* e o enxaguatório apresentaram grande potencial antimicrobiano frente aos micro-organismos testados, exceto para o óleo essencial puro para *Enterococcus faecalis*;
- Por meio da Curva da Morte verificou-se que nos tempos de 10 e 30 minutos ainda havia células viáveis para todos os enxaguatórios testados.
- A atividade citotóxica do óleo essencial de *Casearia sylvestris* frente a fibroblastos gengivais L929 foi estatisticamente menor do que a da clorexidina 0,12%;
- A citotoxicidade do óleo essencial é tempo-dependente, mas após o período de 30 minutos é reduzida, enquanto a da clorexidina 0,12% permanece altamente citotóxica.
- A citotoxicidade do enxaguatório a base de óleo essencial de *Casearia sylvestris* foi menor estatisticamente que a citotoxicidade da clorexidina 0,12% e do Listerine após 30 minutos.
- O enxaguatório à base de óleo essencial de *Casearia sylvestris* proporcionou maior alteração de cor para a resina Z250 do que a clorexidina 0,12% e a água destilada (controle), sendo essa mudança ocorrida no fator Tempo de todos os parâmetros de cor (L^* , a^* e b^*) analisados isoladamente, enquanto que para o ionômero de vidro não houve diferença estatisticamente significativa para a cor deste material sob as diferentes soluções testadas.
- Houve um aumento estatisticamente significativo na rugosidade superficial do ionômero de vidro quando submetido à clorexidina, enquanto para a resina composta não houve diferença estatisticamente significativa.
- Não houve diferença estatisticamente significativa na microdureza superficial de ambos os materiais restauradores testados.
- A utilização de microscopia eletrônica de varredura possibilitou observar alterações nas superfícies dos materiais restauradores avaliados. No entanto, houve uma deterioração

significativa da superfície do Cimento de Ionômero de vidro modificado por resina quando submetido à clorexidina.

Este estudo abre muitas possibilidades de investigação, para que o produto possa ser utilizado de maneira efetiva e segura, dentro das indicações da *Casearia sylvestris*, posto que é uma formulação promissora.

Referências Bibliográficas

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Albano MN, da Silveira MR, Danielski LG, Florentino D, Petronilho F, Piovezan AP. Anti-inflammatory and antioxidant properties of hydroalcoholic crude extract from *Casearia sylvestris* Sw. (Salicaceae). *J Ethnopharmacol*. 2013;147(3):612-7.

Almeida BS de. Uso de clorexidina associada com a escovação no controle de placa dentária de escolares. *RGO*. 2001;49(3):133-8.

Alves EG, Vinholis AH, Casemmiro LA, Furtado NAJC, Silva MLA, Cunha WR, Martins CHG. Estudo Comparativo de técnicas de screening para avaliação da atividade antibacteriana de extratos brutos de espécies vegetais e de substâncias puras. *Quím Nova*. 2008;31(5):1224-9.

Ameni AZ. Avaliação dos possíveis efeitos tóxicos do extrato fluido de *Casearia sylvestris*, em ratos *Wistar*. [Dissertação]. São Paulo: Universidade de São Paulo, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia; 2011.

Anil N, Hekimoglu C, Sahin S. Color stability of heat-polymerized and autopolymerized soft denture liners. *J Prosthet Dent*. 1999;81(4):481-4.

ANVISA: http://www7.anvisa.gov.br/datavisa/consulta_produto/rconsulta_produto_detalhe.asp, acessado em 11 de dezembro de 2011.

Arantes AB. Desenvolvimento de dentifrícios com extratos fluidos de *calendula officinalis* L., (asteraceae) e *casearia sylvestris* sw., (flacourtiaceae), destinado ao tratamento de periodontias. [Dissertação]. Curitiba: Universidade Federal do Paraná; 2002.

Aykent F, Yondem I, Ozyesil AG, Gunal SK, Avunduk MC, Ozkan S. Effect of different finishing techniques for restorative materials on surface roughness and bacterial adhesion. *J Prosthet Dent*. 2010;103(4):221-7.

Bacchi EM, Sertié JA, Villa N, Katz H. Antiulcer action and toxicity of *Styrax camporum* and *Caesalpinia ferrea*. *Planta Med*. 1995;61 (3):204-7.

Bárány E, Lindberg M, Lodén M. Biophysical characterization of skin damage and recovery after exposure to different surfactants. *Contact Dermatitis*. 1999;40(2):98-103.

Bardal PAP. Avaliação dos efeitos de dentifrícios contendo clorexidina sobre o desenvolvimento de placa dentária, gengivite, cálculo e manchamento extrínseco do esmalte dentário em pacientes sob tratamento ortodôntico. [Dissertação]. Bauru: Universidade de São Paulo, Faculdade de Odontologia de Bauru; 2005.

Basile AC, Sertié JAA, Panizza S, Oshiro TT, Azzolini CA. Pharmacological assay of *Casearia sylvestris*. I: preventive antiulcer activity and toxicity of the leave crude extract. *J Ethnopharmacol*. 1990;30(2):185-97.

Bertolini MM, Oliveira G, Charone S, Soares RMA, Souza IPR, Portela MB. Avaliação in vitro da Microdureza de Cimentos de Ionômero de Vidro Modificados por Resina Submetidos a Biofilme de *Candida albicans*. *Pesq Bras Odontoped Clin Integr*. 2010;10(2):249-55.

Brambilla E, Ionescu A, Gagliani M, Cochis A, Arciola CR, Rimondini L. Biofilm formation on composite resins for dental restorations: an in situ study on the effect of chlorhexidine mouthrinses. *Int J Artif Organs*. 2012;35(10):792-9.

Brandão RB, Martin CC, Catirise AB, de Castro E, Silva M, Evison MP, Guimarães MA. Heat induced changes to dental resin composites: a reference in forensic investigations? *J Forensic Sci*. 2007;52(4):913-9.

Buskühl, H. Avaliação in vitro do mecanismo de ação citotóxica de Lactonas Sesquiterpênicas e outras substâncias isoladas de *Vernonia scorpioides* (LAM) PERS. [Dissertação]. Itajaí: Universidade do Vale do Itajaí, 2007.

Carvalho ES, Santos AG2, Cavalheiro AJ. Identificação de diterpenos clerodânicos em diferentes órgãos de *Casearia sylvestris* Swartz. *Rev Ciênc Farm Básica Apl*. 2009; 30(3):277-84.

Carvalho TC. Avaliação do potencial antimicrobiano de extratos brutos, frações e substâncias isoladas de *Miconia rubiginosa* e *Viguiera arenaria* frente a microorganismos causadores de infecções endodônticas [Dissertação]. Franca: Universidade de Franca; 2009.

Carvalho, Paulo Ernani Ramalho. Embrapa Florestas. Cafezeiro-do-Mato - *Casearia sylvestris*. 138. Brasília: Colombo, EMBRAPA-CNPq; 2007, 16 p.

Cavallari MM, Gimenes MA, Billot C, Torres RB, Zucchi MI, Cavalheiro AJ, Bouvet JM. Population genetic relationships between *Casearia sylvestris* (Salicaceae) varieties occurring sympatrically and allopatrically in different ecosystems in south-east Brazil. *Ann Bot*. 2010;106(4):627-36.

Chava VR, Manjunath SM, Rajanikanth AV, Sridevi N. The efficacy of neem extract on four microorganisms responsible for causing dental caries viz *Streptococcus mutans*, *Streptococcus salivarius*, *Streptococcus mitis* and *Streptococcus sanguis*: an in vitro study. *J Contemp Dent Pract*. 2012;13(6):769-72.

Cintra-Francischinelli M, Silva MG, Andréo-Filho N, Gerenutti M, Cintra AC, Giglio JR, Leite GB, Cruz-Höfling MA, Rodrigues-Simioni L, Oshima-Franco Y. Antibiothropic action of *Casearia sylvestris* Sw. (Flacourtiaceae) extracts. *Phytother Res*. 2008;22(6):784-90.

Claffey N. Essential oil mouthwashes: a key component in oral health management. *J. Clin. Periodont*. 2003;30(Suppl. 5):22-4.

Claydon N, Addy M, Jackson R, Smith S, Newcombe RG. Studies on the effect of polyvinyl pyrrolidone on the activity of chlorhexidine mouthrinses: plaque and stain. *J Clin Periodontol*. 2001;28(6):558-64.

Clinical and Laboratory Standards Institute (2006) Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically, 7th ed. Approved standard M7-A7. Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne, PA.

CLSI. Clinical and Laboratory Standards Institute. Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically. Approved standard M100-S15, 2005.

Commission Internationale de L'Eclairage Recommendations on Uniform Colour Spaces, Colour Terms Supplement 2 to publication 15 Paris Bureau Central de la CIE 1978.

CRODA: www.croda.com.br

Croteau R, Kutchan TM, Lewis NG. Natural products (secondary metabolites). In: Buchanan B, Gruissem W, Jones R. (Eds.), *Biochemistry and Molecular Biology of Plants*. American Society of Plant Physiologists, 2000, 1250-318.

Cunha WR, Cunha LCS, Silva MLA, Furtado NAJC, Vinhólis AHC, Martins CHG, Da Silva Filho AA. Antibacterial activity of triterpene acids and semi-synthetic derivatives against oral pathogens. *Zeitschrift für Naturforschung. C A J. of Biosc*. 2007; 62(9-10):668-72.

Cury VGC. Eficácia terapêutica da *Casearia sylvestris* sobre herpes labial e perspectiva de uso em saúde coletiva. [Dissertação]. Piracicaba: Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Odontologia de Piracicaba; 2005.

Da Silva SL, Calgarotto AK, Chaar JS, Marangoni S. Isolation and characterization of ellagic acid derivatives isolated from *Casearia sylvestris* SW aqueous extract with anti-PLA(2) activity. *Toxicon*. 2008;52(6): 655-66.

De Albuquerque RF Jr, Head TW, Mian H, Rodrigo A, Müller K, Sanches K, Ito IY. Reduction of salivary *S. aureus* and mutans group streptococci by a preprocedural chlorhexidine rinse and maximal inhibitory dilutions of chlorhexidine and cetylpyridinium. *Quintessence Int*. 2004;35(8):635-40.

De Carvalho PR, Furlan M, Young MC, Kingston DG, Bolzani VS. Acetylated DNA-damaging clerodane diterpenes from *Casearia sylvestris*. *Phytochemistry*. 1998; 49(6):1659-62.

De Mesquita ML, de Paula JE, Pessoa C, Moraes MO, Costa-Lotufo LV, Grougnet R, Michel S, Tillequin F, Espindola LS. Cytotoxic activity of Brazilian Cerrado plants used in traditional medicine against cancer cell lines. *J Ethnopharmacol*. 2009;123(3):439-45.

Dinelli W, Candido MSM, Catirse ABCE. Effects of cigarettes smoking on the esthetical of translucent restoration materials. *Rev Assoc Paul Cir Dent*. 1996;50(2):121-4.

Dos Santos AG, Ferreira PM, Vieira Júnior GM, Perez CC, Gomes Tininis A, Silva GH, Bolzani V da S, Costa-Lotufo LV, Pessoa C do O, Cavaleiro AJ. Casearin X, its degradation product and other clerodane diterpenes from leaves of *Casearia sylvestris*: evaluation of cytotoxicity against normal and tumor human cells. *Chem Biodivers*. 2010;7(1):205-15.

Duarte MA, Midena RZ, Zeferino MA, Vivan RR, Weckwerth PH, Dos Santos F, Guerreiro-Tanomaru JM, Tanomaru-Filho M. Evaluation of pH and calcium ion release of calcium hydroxide pastes containing different substances. *J Endod*. 2009;35(9):1274-7.

Erdemir EO, Sengün A, Ulker M. Cytotoxicity of mouthrinses on epithelial cells by micronucleus test. *Eur J Dent*. 2007;1(2):80-5.

Ertas E, Guler AU, Yucel AC, Koprulu H, Guler E. Color stability of resin composites after immersion in different drinks. *Dent Mater J*. 2006; 25(2):371-6.

Espindola LS, Vasconcelos Júnior JR, de Mesquita ML, Marquié P, de Paula JE, Mambu L, Santana JM. Trypanocidal activity of a new diterpene from *Casearia sylvestris* var. *lingua*. *Planta Med*. 2004;70(11):1093-5.

Esteves I, Souza IR, Rodrigues M, Cardoso LG, Santos LS, Sertié JA, Perazzo FF, Lima LM, Schneedorf JM, Bastos JK, Carvalho JC. Gastric antiulcer and anti-inflammatory activities of the essential oil from *Casearia sylvestris* Sw. *J Ethnopharmacol*. 2005;101(1-3):191-6.

- Farge P. [Recent findings in the etiopathogenesis of caries]. Arch Pediatr. 1998;5(10):1140-4.
- Faria G, Cardoso CR, Larson RE, Silva JS, Rossi MA. Chlorhexidine-induced apoptosis or necrosis in L929 fibroblasts: A role for endoplasmic reticulum stress. Toxicol Appl Pharmacol. 2009;234(2):256-65.
- Faria Jr. EB. Avaliação da atividade biológica do extrato das folhas de *Casearia sylvestris* e suas frações sobre *Streptococcus mutans* [Monografia]. Lavras: Universidade do estado de Minas Gerais, Centro Universitário de Lavras; 2005.
- Farmacopéia Brasileira IV, parte II, 1º - 5º fascículos, 1996 - 2004.
- Ferreira PM, Santos AG, Tininis AG, Costa PM, Cavalheiro AJ, Bolzani VS, Moraes MO, Costa-Lotufo LV, Montenegro RC, Pessoa C. Casearin X exhibits cytotoxic effects in leukemia cells triggered by apoptosis. Chem Biol Interact. 2010;188(3):497-504.
- Festuccia MS, Garcia L da F, Cruvinel DR, Pires-De-Souza F de C. Color stability, surface roughness and microhardness of composites submitted to mouthrinsing action. J Appl Oral Sci. 2012;20(2):200-5.
- Fernandes Filho, ES; Moraes, SM; Fonseca, SGC; Mota, OML. Preparação e avaliação clínica de um anti-séptico bucal à base do óleo essencial da planta medicinal *Lippia sidoides* Cham (Alecrim pimenta). Rev. ABO nac. 1998;6(5):323-5.
- Flemingson, Emmadi P, Ambalavanan N, Ramakrishnan T, Vijayalakshmi R. Effect of three commercial mouth rinses on cultured human gingival fibroblast: an in vitro study. Indian J Dent Res. 2008;19(1):29-35.
- Formisano C, Senatore F, Bruno M, Bellone G. Chemical composition and antimicrobial activity of the essential oil of *Phlomis ferruginea* Ten. (Lamiaceae) growing wild in Southern Italy. Flavour Fragrance J. 2006;21:848-51.
- Freeman D, Wenerstrom G, Spruance S. Treatment of recurrent herpes simplex labialis with topical butylated hydroxytoluene. Clin Pharmacol Ther. 1985;38(1):56-9.
- Freitas DB. Estudo da alteração de cor de resinas compostas, influenciada pela clorexidina associada ao vinho tinto doce. [Dissertação]. Ribeirão Preto: Universidade de São Paulo, Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto; 2006.

Freitas VS, Lopes MA, Meireles JRC, Reis L, Cerqueira EMM. Efeitos genotóxicos de fatores considerados de risco para o câncer bucal. Rev Baiana de Saúde Pública. 2005; 29(2):189-99.

Gales AC, Mendes RE, Sader JHRS. Comparação das atividades antimicrobianas de meropenem e imipenem/cilastatina: o laboratório necessita testar rotineiramente os dois antimicrobianos? J. Bras. Patol. Med. Lab. 2002; 38(1):13-20.

Garcia BH, dos Santos AG; Felipe DF. Desenvolvimento de formulação contendo extrato de própolis vermelha para prevenção da cárie; VII EPCC – anais eletrônicos. 2011.

Giannelli M, Chellini F, Margheri M, Tonelli P, Tani A. Effect of chlorhexidine digluconate on different cell types: a molecular and ultrastructural investigation. Toxicol In Vitro. 2008;22(2):308-17.

Gobbo-Neto L, Lopes NP. Plantas medicinais: fatores de influência no conteúdo de metabólitos secundários. Quím Nova. 2007;30(2):374-81.

Godoi APT. Efeito *in situ* da associação de chá preto ao uso diário de clorexidina na alteração de cor e rugosidade superficial de resinas compostas. [Dissertação]. Ribeirão Preto: Universidade de São Paulo, Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto; 2009.

Godoi APT, Freitas DB, Trauth KGS, Colucci V, Catirise ABCEB. Combined effect of the association between chlorhexidine and a diet protein on color stability of resin composites. Int J Clin Dent. 2011;4(2):1-9.

Guil-Guerrero J, Campra P. Cytotoxicity screening of endemic plants from Guayana highlands. Trop Biomed. 2009;26(2):149-54.

Gürdal P, Akdeniz BG, Hakan Sen B. The effects of mouthrinses on microhardness and colour stability of aesthetic restorative materials. J Oral Rehabil. 2002;29(9):895-901.

Herrera D, Roldán S, Santacruz I, Santos S, Masdevall M, Sanz M. Differences in antimicrobial activity of four commercial 0.12% chlorhexidine mouthrinse formulations: an in vitro contact test and salivary bacterial counts study. J Clin Periodontol. 2003;30(4):307-14.

Hse KMY, Leung SK, Wei SHY. Resin-ionomer restorative materials for children: a review. Aust Dent J. 1999;44(1):1-11.

Hidalgo E, Dominguez C. Mechanisms underlying chlorhexidine induced cytotoxicity. *Toxicol in Vitro*. 2001;15(4-5):271-6.

Jorge JH, Giampaolo ET, Pavarina AC. Cytotoxicity of the dental materials. A literature review. *Rev Odontol UNESP*. 2004; 33:65-68.

Köhler B, Andréen I. Mutans streptococci and caries prevalence in children after early maternal caries prevention: a follow-up at eleven and fifteen years of age. *Caries Res*. 2010;44(5):453-8.

Kouidhi B, Zmantar T, Mahdouani K, Hentati H, Bakhrouf A. Antibiotic resistance and adhesion properties of oral Enterococci associated to dental caries. *BMC Microbiol*. 2011;11:155.

Le Cointe P. Amazônia Brasileira. Árvores e plantas úteis. Nacional. São Paulo, Brasil. 489p. (1934).

Leard A, Addy M. The propensity of different brands of tea and coffee to cause staining associated with chlorhexidine. *Journal of Clinical Periodontology*. 1997;24(2):115-118.

Lee TH, Hu CC, Lee SS, Chou MY, Chang YC. Cytotoxicity of chlorhexidine on human osteoblastic cells is related to intracellular glutathione levels. *Int Endod J*. 2010;43(5):430-5.

Lee YK, El Zawahry M, Noaman KM, Powers JM. Effect of mouthwash and accelerated aging on the color stability of esthetic restorative materials. *Am J Dent*. 2000;13(3):159-61.

Lee YK, Powers JM. Combined effect of staining substances on the discoloration of esthetic Class V dental restorative materials. *J Mater Sci Mater Med*. 2007;18(1):165-70.

Lee YK, Powers JM. Influence of salivary organic substances on the discoloration of esthetic dental materials – a review. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater*. 2006;76(2):397-402.

Lee YK. Comparison of CIELAB DeltaE(*) and CIEDE2000 color-differences after polymerization and thermocycling of resin composites. *Dent Mater*. 2005;21(7):678-82.

Lessa FC, Aranha AM, Nogueira I, Giro EM, Hebling J, Costa CA. Toxicity of chlorhexidine on odontoblast-like cells. *J Appl Oral Sci*. 2010;18(1):50-8.

Lima AL, Valença AMG, Albuquerque FR, Silva NB. Análise do pH e da viscosidade nos enxaguatórios bucais fluoretados disponíveis comercialmente na cidade de João Pessoa-PB. *Pesqui bras odontopediatria clín integr*. 2005;5(3):223-8.

Magalhães CF. Efeito de extratos e frações de *Piper aduncum* sobre o crescimento e metabolismo dos *Streptococcus mutans* e *Streptococcus sanguis*. [Dissertação]. Governador Valadares: Universidade Vale do Rio Doce; 2010.

Maistro EL, Carvalho JC, Mantovani MS. Evaluation of the genotoxic potential of the *Casearia sylvestris* extract on HTC and V79 cells by the comet assay. *Toxicol In Vitro*. 2004;18(3):337-42.

Maneenut C, Tyas MJ. Clinical evaluation of resin-modified glass-ionomer restorative cements in cervical 'abrasion' lesions: one-year results. *Quintessence Int*. 1995;26(10):739-43.

Mariotti AJ, Rumpf DA. Chlorhexidine-induced changes to human gingival fibroblast collagen and non-collagen protein production. *J Periodontol*. 1999;70(12):1443-8.

Marsh PD. Controlling the oral biofilm with antimicrobials. *J Dent*. 2010;38(Suppl 1):S11-5.

Marsh PD. Microbiological aspects of the chemical control of plaque and gingivitis. *J Dent Res*. 1992;71(7):1431-8.

Martins LM. Avaliação da microdureza knoop e do grau de conversão de dois cimentos de ionômero de vidro modificados por resina em função do tipo de polimerização e do tempo. [Dissertação]. Bauru: Universidade de São Paulo, Faculdade de Odontologia de Bauru; 2007.

Mesquita ML, Desrivot J, Bories C, Fournet A, Paula JE, Grellier P, Espindola LS. Antileishmanial and trypanocidal activity of Brazilian Cerrado plants. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2005;100(7):783-7.

Miranda DdeA, Bertoldo CE, Aguiar FH, Lima DA, Lovadino JR. Effects of mouthwashes on Knoop hardness and surface roughness of dental composites after different immersion times. *Braz Oral Res*. 2011;25(2):168-73.

Mossman T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assay. *J Immunol Methods* 1983;65(1-2):55-63.

Oliveira CH, Binotti RS, Barrientos-Astigarraga RE, Graudenz GS, Neto AC. Surfactantes derivados do fruto de coco (*Cocos nucifera* L.) e sensibilidade cutânea. *Ver Brás alerg imunopatol*. 2005;28(3):155-160.

Otten MP, Busscher HJ, van der Mei HC, Abbas F, Van Hoogmoed CG. Retention of antimicrobial activity in plaque and saliva following mouthrinse use in vivo. *Caries Res*. 2010;44(5):459-64.

Palomino JC, Martin A, Camacho M, Guerra H, Swings J, Portaels F. Resazurin Microtiter Assay Plate: Simple and Inexpensive Method for Detection of Drug Resistance in *Mycobacterium tuberculosis*. *Antimicrob Agents Chemother*. 2002;46(8):2720-2.

Peláez MAC, Gómes GCE, Ruiz EF, Lapiedra RC. Colutorios con alcohol y su relación con el cáncer oral. *Análisis crítico de la literatura. Med Oral*. 2004; 9(2):116-23.

Pithon MM, Santos AM, Freitas LMA, Souza RA, Santos RL, Martins FO, Romanos MTV. In vitro assessment of the cytotoxicity of mouthwashes with and without alcohol. *Rev. Cir. Traumatol. Buco-Maxilo-Fac*. 2011;11(1):9-12.

Pontefract H, Hughes J, Kemp K, Newcombe RG, Addy M. The erosive effects of some mouthrinses on enamel: a study in situ. *J Clin Periodontol*. 2001;28(4):319-24.

Prasanth M. Antimicrobial efficacy of different toothpastes and mouthrinses: an in vitro study. *Dent Res J (Isfahan)*. 2011;8(2):85-94.

Pretty IA, Edgar WM, Higham SM. The erosive potential of commercially available mouthrinses on enamel as measured by Quantitative Light-induced Fluorescence (QLF). *J. Dent*. 2003;31(5):313-9.

Prieto AM, Santos AG, Csipak AR, Caliri CM, Silva IC, Arbex MA, Silva FS, Marchi MR, Cavaleiro AJ, Silva DH, Bolzani VS, Soares CP. Chemopreventive activity of compounds extracted from *Casearia sylvestris* (Salicaceae) Sw against DNA damage induced by particulate matter emitted by sugarcane burning near Araraquara, Brazil. *Toxicol Appl Pharmacol*. 2012;265(3):368-72.

Prieto AM, Santos AG, Oliveira APS, Cavaleiro AJ, Silva DHS, Bolzani VS, Varanda EA, Soares CP. Assessment of the chemopreventive effect of casearin B, a clerodane diterpene extracted from *Casearia sylvestris* (Salicaceae). *Food Chem Toxicol*. 2013;53:153-9.

Rajabalian S, Mohammadi M, Mozaffari B. Cytotoxicity evaluation of Persica mouthwash on cultured human and mouse cell lines in the presence and absence of fetal calf serum. *Indian J Dent Res.* 2009;20(2):169-73.

Ramalingam K, Amaechi BT, Ralph RH, Lee VA. Antimicrobial activity of nanoemulsion on cariogenic planktonic and biofilm organisms. *Arch Oral Biol.* 2012; 57(1):15-22.

Redding WR, Booth LC. Effects of chlorhexidine gluconate and chlorous acid-chlorine dioxide on equine fibroblasts and *Staphylococcus aureus*. *Vet Surg.* 1991;20(5):306-10.

Reid M, Edwards N, Sturgeon KV, Murray V. Adverse health effects arising from chemicals found in food and drink reported to the national poisons information centre (London), 1998~2003. *Food Control.* 2007;18(7):783-7.

Reis SRA, Sadigursky M, Andrade MGS, Soares LP, Espirito Santo, AR do, Vilas Bôas DS. Efeito genotóxico do etanol em células da mucosa bucal. *Pesqui odont. Bras.* 2002; 16(3):221-5.

Reis S, Mariot A, Steenbock W. Diversidade e domesticação de plantas medicinais. In: Simões CMO et al. *Farmacognosia: da planta ao medicamento*. 5. ed. Florianópolis/Porto Alegre: UFSC/UFRGS; 2004, 45- 69.

Ríos JL, Recio MC. Medicinal plants and antimicrobial activity. *J. Of Ethnopharmacol.* 2005;100(1-2):80-4.

Rios D, Honório HM, de Araújo PA, Machado MA. Wear and superficial roughness of glass ionomer cements used as sealants, after simulated toothbrushing. *Pesqui Odontol Bras.* 2002;16(4):343-8.

Rodrigues AM, De Paula JE, Degallier N, Molez JE, Espindola LS. Larvicidal activity of some Cerrado plant extracts against *Aedes aegypti*. *J Am Mosq Control Assoc.* 2006;22(2):314-7.

Rowe RC, Sheskey PJ, Owen SC. *Handbook of Pharmaceutical Excipients*. 5 ed. London/Chicago: apha; 2006.

Ruppelt BM, Pereira EF, Gonçalves LC, Pereira NA. Pharmacological screening of plants recommended by folk medicine as anti-snake venom-I. Analgesic and anti-inflammatory activities. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 1991; 86 Suppl 2:203-5.

Ruyter IE, Nilner K, Moller B. Color stability of dental composite resin materials for crown and bridge veneers. *Dent Mater.* 1987;3(5):246-51.

Sadaghiani L, Wilson MA, Wilson NH. Effect of selected mouthwashes on the surface roughness of resin modified glass-ionomer restorative materials. *Dent Mater.* 2007a;23(3):325-34.

Sadaghiani L, Wilson MA, Wilson NH. Effect of selected mouthwashes with and without toothbrushing on the surface hardness of a resin modified glass-ionomer and two compomers. *Eur J Prosthodont Restor Dent.* 2007b;15(3):98-103.

Santos AG, Ferreira PMP, Vieira Júnior GM, Perez CC, Tininis AG, Silva GH, Bolzani VS, Costa-Lotufo LV, Pessoa CÔ, Cavalheiro AJ. Casearin X, its degradation product and other clerodane diterpenes from leaves of *Casearia sylvestris*: evaluation of cytotoxicity against normal and tumor human cells. *Chemistry and Biodiversity.* 2010;7(1):205-15.

Santos RL dos, Pithon MM, Martins FO, Romanos MTV. Citotoxicidade de enxaguatório bucal em células fibroblásticas: avaliação de diferentes tempos/Cytotoxicity of oral mouthrinse in fibroblast cells: evaluation of different times. *Full dent.* 2009;1(1):80-83.

Sassioto MCP, Cardoso Filho N, Facco GG, Sodré ST, Neves N, Purisco SU, Farias AG. Efeito da *Casearia sylvestris* no reparo ósseo com matriz óssea bovina desvitalizada em ratos. *Acta Cir Bras [serial online]* 2004;19(6):637-41.

Scavone O, Grecchi R, Panniza S, Silva RAPS. Guaçatonga (*Casearia sylvestris* Swartz): aspectos botânicos da planta, ensaios bioquímicos e propriedades cicatrizantes da folha. *Anais Farmácia e Química.* 1979; 19:73-81.

Schneider LF, Moraes RR, Cavalcante LM, Sinhoreti MA, Correr-Sobrinho L, Consani S. Cross-link density evaluation through softening tests: effect of ethanol concentration. *Dent Mater.* 2008;24:199-203.

Schneider NFZ, Moura NF, Colpo T, Flach A. The volatile oil composition and antimicrobial activity of *Casearia sylvestris* Swart. *Rev. Bras. Farm.* 2006;87(4):112-4.

Schoenfelder T, Pich CT, Geremias R, Avila S, Daminelli EN, Pedrosa RC, Bettiol J. Antihyperlipidemic effect of *Casearia sylvestris* methanolic extract. *Fitoterapia.* 2008;79(6):465-7.

Schulze KA, Marshal SJ, Gansky SA, Marshall GW. Color stability and hardness in dental composites after accelerated aging. *Dent Mater.* 2003;19(7):612-9.

Sertié JA, Carvalho JC, Panizza S. Antiulcer activity of the crude extract from the leaves of *Casearia sylvestris*. *Pharm Biol.* 2000;38(2):112-9.

Settembrini L, Penugonda B, Scherer W, Strassler H, Hittelman E. Alcohol-containing mouthwashes: effect on composite color. *Oper Dent.* 1995;20(1):14-7.

Shapiro S, Giertsen E, Guggenheim B. An in vitro oral biofilm model for comparing the efficacy of antimicrobial mouthrinses. *Caries Res.* 2002;36(2):93-100.

Shimoda H, Ninomiya K, Nishida N, Yoshino T, Morikawa T, Matsuda H, Yoshikawa M. Anti-hyperlipidemic sesquiterpenes and new sesquiterpene glycosides from the leaves of artichoke (*Cynara scolymus* L.): structure requirement and mode of action. *Bioorg Med Chem Lett.* 2003 ;13(2):223-8.

Silva FA, Baisch ALM, Oliveira B, Battastini AM, Torres F, Racoski G, Silva ES, Alam MF, Apolinario JCG, Lapa AJ. Estudo farmacológicos preliminares dos extratos *Casearia Sylvestris* Swartz. *Acta Amazonica.* 1986;18(1-2):219-29.

Silva FB, Almeida JM, Sousa SMG. Natural medicaments in endodontics - a comparative study of the anti-inflammatory action. *Braz Oral Res.* 2004;18(2):174-9.

Siqueira Gonçalves T, Minghelli Schmitt V, Thomas M, Lopes de Souza MA, Macedo de Menezes L. Cytotoxicity of two autopolymerized acrylic resins used in orthodontics. *Angle Orthod.* 2008;78(5):926-30.

Soares LE, Cortez LR, Zarur RdeO, Martin AA. Scanning electron microscopy and roughness study of dental composite degradation. *Microsc Microanal.* 2012;18(2):289-94.

Souza AB, Martins CH, Souza MG, Furtado NA, Heleno VC, De Sousa JP, Rocha EM, Bastos JK, Cunha WR, Veneziani RC, Ambrósio SR. Antimicrobial activity of terpenoids from *Copaifera langsdorffii* Desf. against cariogenic bacteria. *Phytother Res.* 2011;25(2):215-20.

Spandre P. Produção de óleo essencial e propagação vegetativa de *Casearia Sylvestris* Swartz. Curitiba [Tese]. Curitiba: Universidade Federal do Paraná, 2010.

Stoppa MA, Casemiro LA, Vinholis AHC, Cunha WR, Silva MLA, Martins CHG, Furtado NAJC. Estudo comparativo entre as metodologias preconizadas pelo CLSI e pelo EUCAST para avaliação da atividade antifúngica. *Quím. Nova.* 2009;32(2):498-502.

Taninis AG, Assonuma MM, Telascree M, Perez CC, Silva MRSRM, Favoreto R, Cavalheiro AJ. Composição e variabilidade química de óleo essencial de *Casearia sylvestris* SW. Rev. Bra. Pl. Med. 2006;8(4):132-6.

Tavares W. Introdução ao estudo dos antimicrobianos. In: Manual de antibióticos e quimioterápicos anti-infecciosos. 2. ed. Rio de Janeiro: Atheneu; 1996.

Tavares WLF, Apolônio ACM, Gomes RT, Teixeira KIR, Brandão MGL, Santos VR. Assessment of the antimicrobial activity of *Casearia sylvestris* extract against oral pathogenic microorganisms. Rev. ciênc. farm. básica apl. 2008;29(3):257-60.

Thylstrup A, Fejerskok O. Cariologia Clínica. São Paulo: Editora Santos; 1995.

Tolentino ES, Chinellato LEM, Tarzia O. Avaliação da aceitação de pacientes em relação ao uso de antissépticos orais e estudo do pH das diferentes soluções; Rev. bras. odontol. 2010;67(1):13-8.

Torres CRG, Kubo CH, Anido AA, Rodrigues JR. Agentes antimicrobianos e seu potencial de uso na Odontologia. Pós-Grad Rev Fac Odontol São José dos Campos. 2000;3(2):42-52.

Trauth KG, Godoi AP, Colucci V, Corona SA, Catirise AB. The influence of mouthrinses and simulated toothbrushing on the surface roughness of a nanofilled composite resin. Braz Oral Res. 2012;26(3):209-14.

Trump BF, Berezsky IK, Chang SH, Phelps PC. The pathways of cell death: oncosis, apoptosis, and necrosis. Toxicol Pathol. 1997;25(1):82-8.

van der Ouderaa FJ. Anti-plaque agents. Rationale and prospects for prevention of gingivitis and periodontal disease. J Clin Periodontol. 1991;18(6):447-54.

Vital JCA, SILVA AA, Souza MA, Ferreir AP, Vital RWF. Avaliação da Citotoxicidade de Materiais Odontológicos Através do Método de MTT e Produção de Óxido Nítrico: Descrição de uma Técnica. Pesq Bras Odontoped Clin Integr. 2008; 8(3):359-65.

Wang W, Zhao J, Wang YH, Smillie TA, Li XC, Khan IA. Diterpenoids from *Casearia sylvestris*. Planta Med. 2009;75(13):1436-41.

Weckwerth PH, Santos F, Duarte MAH, Vivan RR, Weckwerth ACVB. Comparação da atividade antimicrobiana *in vitro* de diferentes antibióticos e extratos hidroalcoólicos e infusão de *Casearia sylvestris* Swart (Guaçatonga) frente a linhagens de *Enterococcus faecalis* isolados da cavidade oral. Salusvita. 2008;27(2):259-74.

Werle ALB, Zanetti GD, Ceron CS, Manfron MP. Avaliação da atividade de *Casearia sylvestris* Swartz (Flacourtiaceae) sobre os níveis séricos de triglicerídeos em ratos. Rev Bras Farmacogn. 2009;19(2A):400-2.

Wikén Albertsson K, Persson A, van Dijken JW. Effect of essential oils containing and alcohol-free chlorhexidine mouthrinses on cariogenic micro-organisms in human saliva. Acta Odontol Scand. 2013;71(3-4):883-91.

Yap AU, Tan BW, Tay LC, Chang KM, Loy TK, Mok BY. Effect of mouthrinses on microhardness and wear of composite and compomer restoratives. Oper Dent. 2003;28(6):740-6.

Yunes RA, Pedrosa RC, Cechinel Filho V. Fármacos e Fitoterápicos: A necessidade do desenvolvimento da indústria de Fitoterápicos e Fitofármacos no Brasil. Química Nova. 2000;24(1):147-152.

Zanela NL, Bijella MF, Rosa OP. The influence of mouthrinses with antimicrobial solutions on the inhibition of dental plaque and on the levels of mutans streptococci in children. Pesqui Odontol Bras. 2002;16(2):101-6.

Zanin SMW, Miguel MD, Barreira SMW, Nakashima T, Cury CD, Costa CK. Enxaguatório bucal: principais ativos e desenvolvimento de fórmula contendo extrato hidroalcoólico de *Salvia officinalis* L. Visão Acadêmica. 2007;8(1):19-24.

Zhang W, Torabinejad M, Li Y. Evaluation of cytotoxicity of MTAD using the MTT-tetrazolium method. J Endod. 2003;29(10):654-7.

Apêndices

APÊNDICES

Apêndice A - Dados de células viáveis (%) após exposição ao óleo essencial de *Casearia sylvestris* em diferentes tempos e concentrações.

Concentração	n	T1 (30 minutos)	T2 (24 horas)
4000	R1	75,122	11,543
	R2	71,291	16,135
	R3	78,316	11,843
3200	R1	68,990	12,543
	R2	74,895	18,954
	R3	76,073	12,908
2000	R1	64,142	12,719
	R2	71,841	19,0916
	R3	67,500	10,925
1500	R1	101,470	18,576
	R2	100,713	18,371
	R3	102,227	16,395
1000	R1	64,421	18,928
	R2	82,539	22,927
	R3	73,480	17,912
750+CHX	R1	42,463	19,478
	R2	50,555	22,900
	R3	46,509	18,387
750	R1	79,225	20,763
	R2	96,593	23,090
	R3	89,118	18,641
500	R1	52,098	13,541
	R2	65,724	9,203
	R3	58,911	14,630
375	R1	72,597	18,023
	R2	73,875	12,601
	R3	91,779	17,763
250	R1	63,054	19,809
	R2	83,912	9,592
	R3	86,227	22,577
125	R1	53,637	19,167
	R2	87,533	11,864
	R3	82,870	18,987
Solução mãe	R1	98,485	76,355
	R2	107,716	79,140
	R3	117,650	73,573
CHX	R1	18,324	10,652
	R2	18,347	7,567
	R3	19,127	11,4598

Apêndice B - Comparação entre médias dos postos de diferentes concentrações de óleo essencial de *Casearia sylvestris*.

Amostras comparadas (comparações duas a duas)			Diferenças entre médias	Valores críticos (Ô)			Signifi- cância
				0,05	0,01	0.001	
4000t1	X 4000t2	:	46.6667	13.2950	17.7249	23.1451	0,1 %
4000t1	X 3200t1	:	1.6667	13.2950	17.7249	23.1451	ns
4000t1	X 3200t2	:	40.0000	13.2950	17.7249	23.1451	0,1 %
4000t1	X 2000t1	:	7.0000	13.2950	17.7249	23.1451	ns
4000t1	X 2000t2	:	41.3333	13.2950	17.7249	23.1451	0,1 %
4000t1	X 1500t1	:	18.0000	13.2950	17.7249	23.1451	1 %
4000t1	X 1500t2	:	35.3333	13.2950	17.7249	23.1451	0,1 %
4000t1	X 1000t1	:	1.3333	13.2950	17.7249	23.1451	ns
4000t1	X 1000t2	:	29.0000	13.2950	17.7249	23.1451	0,1 %
4000t1	X 750+chxt1	:	16.0000	13.2950	17.7249	23.1451	5 %
4000t1	X 750+chxt2	:	25.6667	13.2950	17.7249	23.1451	0,1 %
4000t1	X 750t1	:	11.3333	13.2950	17.7249	23.1451	ns
4000t1	X 750t2	:	23.6667	13.2950	17.7249	23.1451	0,1 %
4000t1	X 500t1	:	11.3333	13.2950	17.7249	23.1451	ns
4000t1	X 500t2	:	46.6667	13.2950	17.7249	23.1451	0,1 %
4000t1	X 375t1	:	3.6667	13.2950	17.7249	23.1451	ns
4000t1	X 375t2	:	40.6667	13.2950	17.7249	23.1451	0,1 %
4000t1	X 250t1	:	3.0000	13.2950	17.7249	23.1451	ns
4000t1	X 250t2	:	32.6667	13.2950	17.7249	23.1451	0,1 %
4000t1	X 125t1	:	2.3333	13.2950	17.7249	23.1451	ns
4000t1	X 125t2	:	33.6667	13.2950	17.7249	23.1451	0,1 %
4000t1	X smt1	:	19.0000	13.2950	17.7249	23.1451	1 %
4000t1	X smt2	:	2.6667	13.2950	17.7249	23.1451	ns
4000t1	X chxt1	:	32.3333	13.2950	17.7249	23.1451	0,1 %
4000t1	X chxt2	:	53.3333	13.2950	17.7249	23.1451	0,1 %
4000t2	X 3200t1	:	48.3333	13.2950	17.7249	23.1451	0,1 %
4000t2	X 3200t2	:	6.6667	13.2950	17.7249	23.1451	ns
4000t2	X 2000t1	:	39.6667	13.2950	17.7249	23.1451	0,1 %
4000t2	X 2000t2	:	5.3333	13.2950	17.7249	23.1451	ns
4000t2	X 1500t1	:	64.6667	13.2950	17.7249	23.1451	0,1 %
4000t2	X 1500t2	:	11.3333	13.2950	17.7249	23.1451	ns
4000t2	X 1000t1	:	45.3333	13.2950	17.7249	23.1451	0,1 %
4000t2	X 1000t2	:	17.6667	13.2950	17.7249	23.1451	5 %
4000t2	X 750+chxt1	:	30.6667	13.2950	17.7249	23.1451	0,1 %
4000t2	X 750+chxt2	:	21.0000	13.2950	17.7249	23.1451	1 %
4000t2	X 750t1	:	58.0000	13.2950	17.7249	23.1451	0,1 %
4000t2	X 750t2	:	23.0000	13.2950	17.7249	23.1451	1 %
4000t2	X 500t1	:	35.3333	13.2950	17.7249	23.1451	0,1 %
4000t2	X 500t2	:	0.0000	13.2950	17.7249	23.1451	ns
4000t2	X 375t1	:	50.3333	13.2950	17.7249	23.1451	0,1 %
4000t2	X 375t2	:	6.0000	13.2950	17.7249	23.1451	ns
4000t2	X 250t1	:	49.6667	13.2950	17.7249	23.1451	0,1 %
4000t2	X 250t2	:	14.0000	13.2950	17.7249	23.1451	5 %
4000t2	X 125t1	:	49.0000	13.2950	17.7249	23.1451	0,1 %
4000t2	X 125t2	:	13.0000	13.2950	17.7249	23.1451	ns
4000t2	X smt1	:	65.6667	13.2950	17.7249	23.1451	0,1 %
4000t2	X smt2	:	49.3333	13.2950	17.7249	23.1451	0,1 %
4000t2	X chxt1	:	14.3333	13.2950	17.7249	23.1451	5 %
4000t2	X chxt2	:	6.6667	13.2950	17.7249	23.1451	ns
3200t1	X 3200t2	:	41.6667	13.2950	17.7249	23.1451	0,1 %
3200t1	X 2000t1	:	8.6667	13.2950	17.7249	23.1451	ns
3200t1	X 2000t2	:	43.0000	13.2950	17.7249	23.1451	0,1 %
3200t1	X 1500t1	:	16.3333	13.2950	17.7249	23.1451	5 %
3200t1	X 1500t2	:	37.0000	13.2950	17.7249	23.1451	0,1 %
3200t1	X 1000t1	:	3.0000	13.2950	17.7249	23.1451	ns
3200t1	X 1000t2	:	30.6667	13.2950	17.7249	23.1451	0,1 %
3200t1	X 750+chxt1	:	17.6667	13.2950	17.7249	23.1451	5 %
3200t1	X 750+chxt2	:	27.3333	13.2950	17.7249	23.1451	0,1 %
3200t1	X 750t1	:	9.6667	13.2950	17.7249	23.1451	ns
3200t1	X 750t2	:	25.3333	13.2950	17.7249	23.1451	0,1 %

3200t1	X 500t1	:	13.0000	13.2950	17.7249	23.1451	ns
3200t1	X 500t2	:	48.3333	13.2950	17.7249	23.1451	0,1 %
3200t1	X 375t1	:	2.0000	13.2950	17.7249	23.1451	ns
3200t1	X 375t2	:	42.3333	13.2950	17.7249	23.1451	0,1 %
3200t1	X 250t1	:	1.3333	13.2950	17.7249	23.1451	ns
3200t1	X 250t2	:	34.3333	13.2950	17.7249	23.1451	0,1 %
3200t1	X 125t1	:	0.6667	13.2950	17.7249	23.1451	ns
3200t1	X 125t2	:	35.3333	13.2950	17.7249	23.1451	0,1 %
3200t1	X smt1	:	17.3333	13.2950	17.7249	23.1451	5 %
3200t1	X smt2	:	1.0000	13.2950	17.7249	23.1451	ns
3200t1	X chxt1	:	34.0000	13.2950	17.7249	23.1451	0,1 %
3200t1	X chxt2	:	55.0000	13.2950	17.7249	23.1451	0,1 %
3200t2	X 2000t1	:	33.0000	13.2950	17.7249	23.1451	0,1 %
3200t2	X 2000t2	:	1.3333	13.2950	17.7249	23.1451	ns
3200t2	X 1500t1	:	58.0000	13.2950	17.7249	23.1451	0,1 %
3200t2	X 1500t2	:	4.6667	13.2950	17.7249	23.1451	ns
3200t2	X 1000t1	:	38.6667	13.2950	17.7249	23.1451	0,1 %
3200t2	X 1000t2	:	11.0000	13.2950	17.7249	23.1451	ns
3200t2	X 750+chxt1	:	24.0000	13.2950	17.7249	23.1451	0,1 %
3200t2	X 750+chxt2	:	14.3333	13.2950	17.7249	23.1451	5 %
3200t2	X 750t1	:	51.3333	13.2950	17.7249	23.1451	0,1 %
3200t2	X 750t2	:	16.3333	13.2950	17.7249	23.1451	5 %
3200t2	X 500t1	:	28.6667	13.2950	17.7249	23.1451	0,1 %
3200t2	X 500t2	:	6.6667	13.2950	17.7249	23.1451	ns
3200t2	X 375t1	:	43.6667	13.2950	17.7249	23.1451	0,1 %
3200t2	X 375t2	:	0.6667	13.2950	17.7249	23.1451	ns
3200t2	X 250t1	:	43.0000	13.2950	17.7249	23.1451	0,1 %
3200t2	X 250t2	:	7.3333	13.2950	17.7249	23.1451	ns
3200t2	X 125t1	:	42.3333	13.2950	17.7249	23.1451	0,1 %
3200t2	X 125t2	:	6.3333	13.2950	17.7249	23.1451	ns
3200t2	X smt1	:	59.0000	13.2950	17.7249	23.1451	0,1 %
3200t2	X smt2	:	42.6667	13.2950	17.7249	23.1451	0,1 %
3200t2	X chxt1	:	7.6667	13.2950	17.7249	23.1451	ns
3200t2	X chxt2	:	13.3333	13.2950	17.7249	23.1451	5 %
2000t1	X 2000t2	:	34.3333	13.2950	17.7249	23.1451	0,1 %
2000t1	X 1500t1	:	25.0000	13.2950	17.7249	23.1451	0,1 %
2000t1	X 1500t2	:	28.3333	13.2950	17.7249	23.1451	0,1 %
2000t1	X 1000t1	:	5.6667	13.2950	17.7249	23.1451	ns
2000t1	X 1000t2	:	22.0000	13.2950	17.7249	23.1451	1 %
2000t1	X 750+chxt1	:	9.0000	13.2950	17.7249	23.1451	ns
2000t1	X 750+chxt2	:	18.6667	13.2950	17.7249	23.1451	1 %
2000t1	X 750t1	:	18.3333	13.2950	17.7249	23.1451	1 %
2000t1	X 750t2	:	16.6667	13.2950	17.7249	23.1451	5 %
2000t1	X 500t1	:	4.3333	13.2950	17.7249	23.1451	ns
2000t1	X 500t2	:	39.6667	13.2950	17.7249	23.1451	0,1 %
2000t1	X 375t1	:	10.6667	13.2950	17.7249	23.1451	ns
2000t1	X 375t2	:	33.6667	13.2950	17.7249	23.1451	0,1 %
2000t1	X 250t1	:	10.0000	13.2950	17.7249	23.1451	ns
2000t1	X 250t2	:	25.6667	13.2950	17.7249	23.1451	0,1 %
2000t1	X 125t1	:	9.3333	13.2950	17.7249	23.1451	ns
2000t1	X 125t2	:	26.6667	13.2950	17.7249	23.1451	0,1 %
2000t1	X smt1	:	26.0000	13.2950	17.7249	23.1451	0,1 %
2000t1	X smt2	:	9.6667	13.2950	17.7249	23.1451	ns
2000t1	X chxt1	:	25.3333	13.2950	17.7249	23.1451	0,1 %
2000t1	X chxt2	:	46.3333	13.2950	17.7249	23.1451	0,1 %
2000t2	X 1500t1	:	59.3333	13.2950	17.7249	23.1451	0,1 %
2000t2	X 1500t2	:	6.0000	13.2950	17.7249	23.1451	ns
2000t2	X 1000t1	:	40.0000	13.2950	17.7249	23.1451	0,1 %
2000t2	X 1000t2	:	12.3333	13.2950	17.7249	23.1451	ns
2000t2	X 750+chxt1	:	25.3333	13.2950	17.7249	23.1451	0,1 %
2000t2	X 750+chxt2	:	15.6667	13.2950	17.7249	23.1451	5 %
2000t2	X 750t1	:	52.6667	13.2950	17.7249	23.1451	0,1 %
2000t2	X 750t2	:	17.6667	13.2950	17.7249	23.1451	5 %
2000t2	X 500t1	:	30.0000	13.2950	17.7249	23.1451	0,1 %
2000t2	X 500t2	:	5.3333	13.2950	17.7249	23.1451	ns
2000t2	X 375t1	:	45.0000	13.2950	17.7249	23.1451	0,1 %
2000t2	X 375t2	:	0.6667	13.2950	17.7249	23.1451	ns
2000t2	X 250t1	:	44.3333	13.2950	17.7249	23.1451	0,1 %

2000t2	X 250t2	:	8.6667	13.2950	17.7249	23.1451	ns
2000t2	X 125t1	:	43.6667	13.2950	17.7249	23.1451	0,1 %
2000t2	X 125t2	:	7.6667	13.2950	17.7249	23.1451	ns
2000t2	X smt1	:	60.3333	13.2950	17.7249	23.1451	0,1 %
2000t2	X smt2	:	44.0000	13.2950	17.7249	23.1451	0,1 %
2000t2	X chxt1	:	9.0000	13.2950	17.7249	23.1451	ns
2000t2	X chxt2	:	12.0000	13.2950	17.7249	23.1451	ns
1500t1	X 1500t2	:	53.3333	13.2950	17.7249	23.1451	0,1 %
1500t1	X 1000t1	:	19.3333	13.2950	17.7249	23.1451	1 %
1500t1	X 1000t2	:	47.0000	13.2950	17.7249	23.1451	0,1 %
1500t1	X 750+chxt1	:	34.0000	13.2950	17.7249	23.1451	0,1 %
1500t1	X 750+chxt2	:	43.6667	13.2950	17.7249	23.1451	0,1 %
1500t1	X 750t1	:	6.6667	13.2950	17.7249	23.1451	ns
1500t1	X 750t2	:	41.6667	13.2950	17.7249	23.1451	0,1 %
1500t1	X 500t1	:	29.3333	13.2950	17.7249	23.1451	0,1 %
1500t1	X 500t2	:	64.6667	13.2950	17.7249	23.1451	0,1 %
1500t1	X 375t1	:	14.3333	13.2950	17.7249	23.1451	5 %
1500t1	X 375t2	:	58.6667	13.2950	17.7249	23.1451	0,1 %
1500t1	X 250t1	:	15.0000	13.2950	17.7249	23.1451	5 %
1500t1	X 250t2	:	50.6667	13.2950	17.7249	23.1451	0,1 %
1500t1	X 125t1	:	15.6667	13.2950	17.7249	23.1451	5 %
1500t1	X 125t2	:	51.6667	13.2950	17.7249	23.1451	0,1 %
1500t1	X smt1	:	1.0000	13.2950	17.7249	23.1451	ns
1500t1	X smt2	:	15.3333	13.2950	17.7249	23.1451	5 %
1500t1	X chxt1	:	50.3333	13.2950	17.7249	23.1451	0,1 %
1500t1	X chxt2	:	71.3333	13.2950	17.7249	23.1451	0,1 %
1500t2	X 1000t1	:	34.0000	13.2950	17.7249	23.1451	0,1 %
1500t2	X 1000t2	:	6.3333	13.2950	17.7249	23.1451	ns
1500t2	X 750+chxt1	:	19.3333	13.2950	17.7249	23.1451	1 %
1500t2	X 750+chxt2	:	9.6667	13.2950	17.7249	23.1451	ns
1500t2	X 750t1	:	46.6667	13.2950	17.7249	23.1451	0,1 %
1500t2	X 750t2	:	11.6667	13.2950	17.7249	23.1451	ns
1500t2	X 500t1	:	24.0000	13.2950	17.7249	23.1451	0,1 %
1500t2	X 500t2	:	11.3333	13.2950	17.7249	23.1451	ns
1500t2	X 375t1	:	39.0000	13.2950	17.7249	23.1451	0,1 %
1500t2	X 375t2	:	5.3333	13.2950	17.7249	23.1451	ns
1500t2	X 250t1	:	38.3333	13.2950	17.7249	23.1451	0,1 %
1500t2	X 250t2	:	2.6667	13.2950	17.7249	23.1451	ns
1500t2	X 125t1	:	37.6667	13.2950	17.7249	23.1451	0,1 %
1500t2	X 125t2	:	1.6667	13.2950	17.7249	23.1451	ns
1500t2	X smt1	:	54.3333	13.2950	17.7249	23.1451	0,1 %
1500t2	X smt2	:	38.0000	13.2950	17.7249	23.1451	0,1 %
1500t2	X chxt1	:	3.0000	13.2950	17.7249	23.1451	ns
1500t2	X chxt2	:	18.0000	13.2950	17.7249	23.1451	1 %
1000t1	X 1000t2	:	27.6667	13.2950	17.7249	23.1451	0,1 %
1000t1	X 750+chxt1	:	14.6667	13.2950	17.7249	23.1451	5 %
1000t1	X 750+chxt2	:	24.3333	13.2950	17.7249	23.1451	0,1 %
1000t1	X 750t1	:	12.6667	13.2950	17.7249	23.1451	ns
1000t1	X 750t2	:	22.3333	13.2950	17.7249	23.1451	1 %
1000t1	X 500t1	:	10.0000	13.2950	17.7249	23.1451	ns
1000t1	X 500t2	:	45.3333	13.2950	17.7249	23.1451	0,1 %
1000t1	X 375t1	:	5.0000	13.2950	17.7249	23.1451	ns
1000t1	X 375t2	:	39.3333	13.2950	17.7249	23.1451	0,1 %
1000t1	X 250t1	:	4.3333	13.2950	17.7249	23.1451	ns
1000t1	X 250t2	:	31.3333	13.2950	17.7249	23.1451	0,1 %
1000t1	X 125t1	:	3.6667	13.2950	17.7249	23.1451	ns
1000t1	X 125t2	:	32.3333	13.2950	17.7249	23.1451	0,1 %
1000t1	X smt1	:	20.3333	13.2950	17.7249	23.1451	1 %
1000t1	X smt2	:	4.0000	13.2950	17.7249	23.1451	ns
1000t1	X chxt1	:	31.0000	13.2950	17.7249	23.1451	0,1 %
1000t1	X chxt2	:	52.0000	13.2950	17.7249	23.1451	0,1 %
1000t2	X 750+chxt1	:	13.0000	13.2950	17.7249	23.1451	ns
1000t2	X 750+chxt2	:	3.3333	13.2950	17.7249	23.1451	ns
1000t2	X 750t1	:	40.3333	13.2950	17.7249	23.1451	0,1 %
1000t2	X 750t2	:	5.3333	13.2950	17.7249	23.1451	ns
1000t2	X 500t1	:	17.6667	13.2950	17.7249	23.1451	5 %
1000t2	X 500t2	:	17.6667	13.2950	17.7249	23.1451	5 %
1000t2	X 375t1	:	32.6667	13.2950	17.7249	23.1451	0,1 %

1000t2	X 375t2	:	11.6667	13.2950	17.7249	23.1451	ns
1000t2	X 250t1	:	32.0000	13.2950	17.7249	23.1451	0,1 %
1000t2	X 250t2	:	3.6667	13.2950	17.7249	23.1451	ns
1000t2	X 125t1	:	31.3333	13.2950	17.7249	23.1451	0,1 %
1000t2	X 125t2	:	4.6667	13.2950	17.7249	23.1451	ns
1000t2	X smt1	:	48.0000	13.2950	17.7249	23.1451	0,1 %
1000t2	X smt2	:	31.6667	13.2950	17.7249	23.1451	0,1 %
1000t2	X chxt1	:	3.3333	13.2950	17.7249	23.1451	ns
1000t2	X chxt2	:	24.3333	13.2950	17.7249	23.1451	0,1 %
750+chxt1	X 750+chxt2	:	9.6667	13.2950	17.7249	23.1451	ns
750+chxt1	X 750t1	:	27.3333	13.2950	17.7249	23.1451	0,1 %
750+chxt1	X 750t2	:	7.6667	13.2950	17.7249	23.1451	ns
750+chxt1	X 500t1	:	4.6667	13.2950	17.7249	23.1451	ns
750+chxt1	X 500t2	:	30.6667	13.2950	17.7249	23.1451	0,1 %
750+chxt1	X 375t1	:	19.6667	13.2950	17.7249	23.1451	1 %
750+chxt1	X 375t2	:	24.6667	13.2950	17.7249	23.1451	0,1 %
750+chxt1	X 250t1	:	19.0000	13.2950	17.7249	23.1451	1 %
750+chxt1	X 250t2	:	16.6667	13.2950	17.7249	23.1451	5 %
750+chxt1	X 125t1	:	18.3333	13.2950	17.7249	23.1451	1 %
750+chxt1	X 125t2	:	17.6667	13.2950	17.7249	23.1451	5 %
750+chxt1	X smt1	:	35.0000	13.2950	17.7249	23.1451	0,1 %
750+chxt1	X smt2	:	18.6667	13.2950	17.7249	23.1451	1 %
750+chxt1	X chxt1	:	16.3333	13.2950	17.7249	23.1451	5 %
750+chxt1	X chxt2	:	37.3333	13.2950	17.7249	23.1451	0,1 %
750+chxt2	X 750t1	:	37.0000	13.2950	17.7249	23.1451	0,1 %
750+chxt2	X 750t2	:	2.0000	13.2950	17.7249	23.1451	ns
750+chxt2	X 500t1	:	14.3333	13.2950	17.7249	23.1451	5 %
750+chxt2	X 500t2	:	21.0000	13.2950	17.7249	23.1451	1 %
750+chxt2	X 375t1	:	29.3333	13.2950	17.7249	23.1451	0,1 %
750+chxt2	X 375t2	:	15.0000	13.2950	17.7249	23.1451	5 %
750+chxt2	X 250t1	:	28.6667	13.2950	17.7249	23.1451	0,1 %
750+chxt2	X 250t2	:	7.0000	13.2950	17.7249	23.1451	ns
750+chxt2	X 125t1	:	28.0000	13.2950	17.7249	23.1451	0,1 %
750+chxt2	X 125t2	:	8.0000	13.2950	17.7249	23.1451	ns
750+chxt2	X smt1	:	44.6667	13.2950	17.7249	23.1451	0,1 %
750+chxt2	X smt2	:	28.3333	13.2950	17.7249	23.1451	0,1 %
750+chxt2	X chxt1	:	6.6667	13.2950	17.7249	23.1451	ns
750+chxt2	X chxt2	:	27.6667	13.2950	17.7249	23.1451	0,1 %
750t1	X 750t2	:	35.0000	13.2950	17.7249	23.1451	0,1 %
750t1	X 500t1	:	22.6667	13.2950	17.7249	23.1451	1 %
750t1	X 500t2	:	58.0000	13.2950	17.7249	23.1451	0,1 %
750t1	X 375t1	:	7.6667	13.2950	17.7249	23.1451	ns
750t1	X 375t2	:	52.0000	13.2950	17.7249	23.1451	0,1 %
750t1	X 250t1	:	8.3333	13.2950	17.7249	23.1451	ns
750t1	X 250t2	:	44.0000	13.2950	17.7249	23.1451	0,1 %
750t1	X 125t1	:	9.0000	13.2950	17.7249	23.1451	ns
750t1	X 125t2	:	45.0000	13.2950	17.7249	23.1451	0,1 %
750t1	X smt1	:	7.6667	13.2950	17.7249	23.1451	ns
750t1	X smt2	:	8.6667	13.2950	17.7249	23.1451	ns
750t1	X chxt1	:	43.6667	13.2950	17.7249	23.1451	0,1 %
750t1	X chxt2	:	64.6667	13.2950	17.7249	23.1451	0,1 %
750t2	X 500t1	:	12.3333	13.2950	17.7249	23.1451	ns
750t2	X 500t2	:	23.0000	13.2950	17.7249	23.1451	1 %
750t2	X 375t1	:	27.3333	13.2950	17.7249	23.1451	0,1 %
750t2	X 375t2	:	17.0000	13.2950	17.7249	23.1451	5 %
750t2	X 250t1	:	26.6667	13.2950	17.7249	23.1451	0,1 %
750t2	X 250t2	:	9.0000	13.2950	17.7249	23.1451	ns
750t2	X 125t1	:	26.0000	13.2950	17.7249	23.1451	0,1 %
750t2	X 125t2	:	10.0000	13.2950	17.7249	23.1451	ns
750t2	X smt1	:	42.6667	13.2950	17.7249	23.1451	0,1 %
750t2	X smt2	:	26.3333	13.2950	17.7249	23.1451	0,1 %
750t2	X chxt1	:	8.6667	13.2950	17.7249	23.1451	ns
750t2	X chxt2	:	29.6667	13.2950	17.7249	23.1451	0,1 %
500t1	X 500t2	:	35.3333	13.2950	17.7249	23.1451	0,1 %
500t1	X 375t1	:	15.0000	13.2950	17.7249	23.1451	5 %
500t1	X 375t2	:	29.3333	13.2950	17.7249	23.1451	0,1 %
500t1	X 250t1	:	14.3333	13.2950	17.7249	23.1451	5 %
500t1	X 250t2	:	21.3333	13.2950	17.7249	23.1451	1 %

500t1	X 125t1	:	13.6667	13.2950	17.7249	23.1451	5 %
500t1	X 125t2	:	22.3333	13.2950	17.7249	23.1451	1 %
500t1	X smt1	:	30.3333	13.2950	17.7249	23.1451	0,1 %
500t1	X smt2	:	14.0000	13.2950	17.7249	23.1451	5 %
500t1	X chxt1	:	21.0000	13.2950	17.7249	23.1451	1 %
500t1	X chxt2	:	42.0000	13.2950	17.7249	23.1451	0,1 %
500t2	X 375t1	:	50.3333	13.2950	17.7249	23.1451	0,1 %
500t2	X 375t2	:	6.0000	13.2950	17.7249	23.1451	ns
500t2	X 250t1	:	49.6667	13.2950	17.7249	23.1451	0,1 %
500t2	X 250t2	:	14.0000	13.2950	17.7249	23.1451	5 %
500t2	X 125t1	:	49.0000	13.2950	17.7249	23.1451	0,1 %
500t2	X 125t2	:	13.0000	13.2950	17.7249	23.1451	ns
500t2	X smt1	:	65.6667	13.2950	17.7249	23.1451	0,1 %
500t2	X smt2	:	49.3333	13.2950	17.7249	23.1451	0,1 %
500t2	X chxt1	:	14.3333	13.2950	17.7249	23.1451	5 %
500t2	X chxt2	:	6.6667	13.2950	17.7249	23.1451	ns
375t1	X 375t2	:	44.3333	13.2950	17.7249	23.1451	0,1 %
375t1	X 250t1	:	0.6667	13.2950	17.7249	23.1451	ns
375t1	X 250t2	:	36.3333	13.2950	17.7249	23.1451	0,1 %
375t1	X 125t1	:	1.3333	13.2950	17.7249	23.1451	ns
375t1	X 125t2	:	37.3333	13.2950	17.7249	23.1451	0,1 %
375t1	X smt1	:	15.3333	13.2950	17.7249	23.1451	5 %
375t1	X smt2	:	1.0000	13.2950	17.7249	23.1451	ns
375t1	X chxt1	:	36.0000	13.2950	17.7249	23.1451	0,1 %
375t1	X chxt2	:	57.0000	13.2950	17.7249	23.1451	0,1 %
375t2	X 250t1	:	43.6667	13.2950	17.7249	23.1451	0,1 %
375t2	X 250t2	:	8.0000	13.2950	17.7249	23.1451	ns
375t2	X 125t1	:	43.0000	13.2950	17.7249	23.1451	0,1 %
375t2	X 125t2	:	7.0000	13.2950	17.7249	23.1451	ns
375t2	X smt1	:	59.6667	13.2950	17.7249	23.1451	0,1 %
375t2	X smt2	:	43.3333	13.2950	17.7249	23.1451	0,1 %
375t2	X chxt1	:	8.3333	13.2950	17.7249	23.1451	ns
375t2	X chxt2	:	12.6667	13.2950	17.7249	23.1451	ns
250t1	X 250t2	:	35.6667	13.2950	17.7249	23.1451	0,1 %
250t1	X 125t1	:	0.6667	13.2950	17.7249	23.1451	ns
250t1	X 125t2	:	36.6667	13.2950	17.7249	23.1451	0,1 %
250t1	X smt1	:	16.0000	13.2950	17.7249	23.1451	5 %
250t1	X smt2	:	0.3333	13.2950	17.7249	23.1451	ns
250t1	X chxt1	:	35.3333	13.2950	17.7249	23.1451	0,1 %
250t1	X chxt2	:	56.3333	13.2950	17.7249	23.1451	0,1 %
250t2	X 125t1	:	35.0000	13.2950	17.7249	23.1451	0,1 %
250t2	X 125t2	:	1.0000	13.2950	17.7249	23.1451	ns
250t2	X smt1	:	51.6667	13.2950	17.7249	23.1451	0,1 %
250t2	X smt2	:	35.3333	13.2950	17.7249	23.1451	0,1 %
250t2	X chxt1	:	0.3333	13.2950	17.7249	23.1451	ns
250t2	X chxt2	:	20.6667	13.2950	17.7249	23.1451	1 %
125t1	X 125t2	:	36.0000	13.2950	17.7249	23.1451	0,1 %
125t1	X smt1	:	16.6667	13.2950	17.7249	23.1451	5 %
125t1	X smt2	:	0.3333	13.2950	17.7249	23.1451	ns
125t1	X chxt1	:	34.6667	13.2950	17.7249	23.1451	0,1 %
125t1	X chxt2	:	55.6667	13.2950	17.7249	23.1451	0,1 %
125t2	X smt1	:	52.6667	13.2950	17.7249	23.1451	0,1 %
125t2	X smt2	:	36.3333	13.2950	17.7249	23.1451	0,1 %
125t2	X chxt1	:	1.3333	13.2950	17.7249	23.1451	ns
125t2	X chxt2	:	19.6667	13.2950	17.7249	23.1451	1 %
smt1	X smt2	:	16.3333	13.2950	17.7249	23.1451	5 %
smt1	X chxt1	:	51.3333	13.2950	17.7249	23.1451	0,1 %
smt1	X chxt2	:	72.3333	13.2950	17.7249	23.1451	0,1 %
smt2	X chxt1	:	35.0000	13.2950	17.7249	23.1451	0,1 %
smt2	X chxt2	:	56.0000	13.2950	17.7249	23.1451	0,1 %
chxt1	X chxt2	:	21.0000	13.2950	17.7249	23.1451	1 %

Apêndice C – Dados de células viáveis (%) após exposição aos diferentes enxaguatório.

Solução	n	30 minutos
Enxaguatório + óleo	R1	63,530
	R2	65,793
	R3	60,546
Enxaguatório	R1	72,076
	R2	68,851
	R3	65,073
Listerine	R1	23,709
	R2	19,649
	R3	21,679
CHX 0,12%	R1	18,395
	R2	19,070
	R3	18,732

Apêndice D – Dados de alteração de cor (ΔE^*) para a resina composta.

n	Controle	Enxaguatório a base de óleo essencial de <i>Casearia sylvestris</i>	CHX
R1	0,90	1,30	0,44
R2	1,65	1,89	0,93
R3	2,46	1,78	1,47
R4	0,55	2,82	1,15
R5	0,95	1,12	1,00
R6	0,52	1,18	1,10
R7	1,16	1,52	0,66
R8	1,76	2,52	1,03
R9	1,15	1,72	0,90
R10	1,84	1,46	1,81

Apêndice E – Dados do parâmetro L* para a resina composta.

		T0 (inicial)	T1 (14 dias)
Controle	R1	77,56	78,98
	R2	77,80	79,01
	R3	77,71	79,07
	R4	78,6	78,86
	R5	78,36	79,29
	R6	78,22	79,59
	R7	78,39	79,23
	R8	78,22	79,56
	R9	78,3	79,3
	R10	77,76	79,26
Enxaguatório a base de óleo essencial de <i>Casearia sylvestris</i>	R1	78,34	79,01
	R2	78,18	79,26
	R3	78,57	78,99
	R4	78,17	78,44
	R5	78,30	79
	R6	78,29	78,89
	R7	78,08	79
	R8	78,38	79,22
	R9	77,05	78,87
	R10	78,02	79,17
CHX	R1	78,53	78,86
	R2	78,48	78,59
	R3	78,18	78,96
	R4	78,25	78,42
	R5	78,23	78,85
	R6	78,00	78,74
	R7	78,16	78,44
	R8	78,07	78,78
	R9	78,55	78,63
	R10	77,97	79,07

Apêndice F – Dados do parâmetro a^* para a resina composta.

	n	T0 (inicial)	T1 (14 dias)
Controle	R1	0,86	0,93
	R2	1,00	1,08
	R3	1,01	0,96
	R4	0,59	0,76
	R5	0,51	0,67
	R6	0,54	0,89
	R7	0,63	0,89
	R8	0,63	0,93
	R9	0,64	0,98
	R10	0,70	1,11
Enxaguatório a base de óleo essencial de <i>Casearia sylvestris</i>	R1	0,71	0,82
	R2	0,97	0,85
	R3	0,7	0,91
	R4	0,77	0,72
	R5	0,51	0,81
	R6	1,04	0,81
	R7	0,58	0,9
	R8	0,64	0,85
	R9	0,83	1,01
	R10	0,66	0,76
CHX	R1	0,51	0,62
	R2	0,55	0,83
	R3	0,6	1,01
	R4	0,97	0,75
	R5	0,7	0,97
	R6	0,87	0,92
	R7	0,73	0,92
	R8	0,69	1,04
	R9	0,77	0,95
	R10	0,72	0,97

Apêndice G– Dados do parâmetro b^* para a resina composta.

		T0 (inicial)	T1 (14 dias)
Controle	R1	19,3	18,80
	R2	20,23	19,11
	R3	20,32	18,26
	R4	19,51	19,05
	R5	19,71	18,89
	R6	19,20	19,07
	R7	19,84	19,07
	R8	19,65	18,54
	R9	19,33	18,86
	R10	19,72	18,72
Enxaguatório a base de óleo essencial de <i>Casearia sylvestris</i>	R1	19,51	18,54
	R2	20,22	18,09
	R3	19,73	18,28
	R4	19,56	18,69
	R5	20,14	18,99
	R6	19,76	18,12
	R7	19,23	18,31
	R8	19,55	18,56
	R9	19,92	18,77
	R10	19,79	18,88
CHX	R1	19,60	18,58
	R2	19,45	18,57
	R3	19,30	18,27
	R4	20,03	18,91
	R5	19,33	18,59
	R6	19,40	18,58
	R7	19,50	18,93
	R8	19,73	19,06
	R9	19,25	18,37
	R10	20,11	18,8

Apêndice H – Dados de alteração de cor (ΔE^*) para o cimento de ionômero de vidro modificado por resina.

	Controle	Enxaguatório a base de óleo essencial de <i>Casearia sylvestris</i>	CHX
R1	4,06	4,93	3,39
R2	5,69	6,41	5,69
R3	3,70	5,89	6,29
R4	7,44	5,48	5,47
R5	6,71	5,99	5,54
R6	4,88	7,09	6,00
R7	6,53	7,73	4,06
R8	4,44	5,78	4,55
R9	5,91	3,20	5,35
R10	6,49	4,13	1,66

Apêndice I - Médias de Rugosidade Superficial (Ra) para a resina composta.

		T0 (inicial)	T1 (14 dias)
Controle	R1	0,31	0,32
	R2	0,18	0,49
	R3	0,70	0,20
	R4	0,14	0,27
	R5	0,12	0,33
	R6	0,56	0,17
	R7	0,09	0,27
	R8	0,39	0,18
	R9	0,5	0,28
	R10	0,25	0,24
Enxaguatório a base de óleo essencial de <i>Casearia sylvestris</i>	R1	0,23	0,36
	R2	0,46	0,24
	R3	0,24	0,26
	R4	0,09	0,18
	R5	0,19	0,19
	R6	0,24	0,26
	R7	0,19	0,26
	R8	0,16	0,15
	R9	0,39	0,23
	R10	0,17	0,20
CHX	R1	0,17	0,23
	R2	0,18	0,17
	R3	0,27	0,34
	R4	0,49	0,36
	R5	0,27	0,19
	R6	0,09	0,18
	R7	0,2	0,3
	R8	0,25	0,39
	R9	0,53	0,32
	R10	0,23	0,14

Apêndice J - Médias de Rugosidade Superficial (μm) para o cimento de ionômero de vidro modificado por resina.

		T0 (inicial)	T1 (14 dias)
Controle	R1	1,15	1,06
	R2	0,87	0,74
	R3	0,51	0,43
	R4	0,34	0,40
	R5	0,51	1,42
	R6	0,53	1,62
	R7	0,74	1,6
	R8	0,69	0,92
	R9	0,84	1,14
	R10	0,41	0,76
Enxaguatório a base de óleo essencial de <i>Casearia sylvestris</i>	R1	0,84	0,78
	R2	1,06	0,39
	R3	1,37	0,98
	R4	0,82	0,37
	R5	0,80	0,89
	R6	1,07	0,44
	R7	0,34	0,36
	R8	1,67	1,66
	R9	1,15	0,93
	R10	1,46	0,78
CHX	R1	0,39	3,05
	R2	0,45	0,86
	R3	0,60	3,40
	R4	0,98	0,74
	R5	0,69	1,00
	R6	0,66	1,09
	R7	0,48	1,18
	R8	0,31	2,32
	R9	0,34	1,1
	R10	0,24	1,71

Apêndice L - Médias de Microdureza Superficial (KN) para a resina composta.

	n	T0 (inicial)	T1 (14 dias)
Controle	R1	73,72	67,2
	R2	78,35	92,33
	R3	77,75	71,3
	R4	63,90	80,27
	R5	65,05	68,12
	R6	64,55	63,26
	R7	67,75	72,13
	R8	73,10	76,95
	R9	71,77	71,65
	R10	61,02	55,32
Enxaguatório a base de óleo essencial de <i>Casearia sylvestris</i>	R1	64,50	62,16
	R2	61,62	65,9
	R3	65,80	75,05
	R4	68,60	76,02
	R5	66,90	61,90
	R6	70,67	63,65
	R7	58,90	59,87
	R8	68,07	67,57
	R9	66,55	71,20
	R10	68,17	81,60
CHX	R1	66,52	72,10
	R2	68,20	69,20
	R3	70,70	75,67
	R4	80,27	72,15
	R5	65,62	69,07
	R6	65,80	71,77
	R7	46,87	55,72
	R8	60,02	67,40
	R9	64,45	67,82
	R10	60,87	78,23

Apêndice M- Médias de Microdureza Superficial (KN) para o cimento de ionômero de vidro modificado por resina.

	n	T0 (inicial)	T2 (14 dias)
Controle	R1	40,37	61,25
	R2	73,23	80,60
	R3	49,85	56,17
	R4	57,40	72,29
	R5	56,00	66,71
	R6	109,02	101,78
	R7	135,30	111,2
	R8	98,18	120,33
	R9	39,75	55,12
	R10	73,23	80,60
Enxaguatório a base de óleo essencial de <i>Casearia sylvestris</i>	R1	124,17	131,81
	R2	51,43	40,75
	R3	58,81	63,43
	R4	87,15	109,68
	R5	45,98	58,50
	R6	58,57	41,25
	R7	42,08	103,31
	R8	21,88	28,67
	R9	84,55	93,37
	R10	60,50	53,75
CHX	R1	48,53	56,50
	R2	47,00	52,58
	R3	43,34	56,20
	R4	39,75	49,62
	R5	29,41	44,43
	R6	40,78	48,66
	R7	65,36	97,00
	R8	32,43	50,00
	R9	51,80	43,43
	R10	35,00	63,62