MARINA MOSCARDINI VILELA

**FORMULAÇÃO À BASE DE UM EXTRATO DO CHÁ VERDE DESENVOLVIDA PARA
USO BUCAL: AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA
E DA ALTERAÇÃO DE COR DENTAL**

Dissertação apresentada à Faculdade de Odontologia de
Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo para
obtenção do título de Mestre em Ciências. Programa:
Odontopediatria
Área de Concentração: Odontopediatria

ORIENTADORA: PROFA. DRA. ANDIARA DE ROSSI

Ribeirão Preto

2015

AUTORIZAÇÃO PARA REPRODUÇÃO

Autorizo a reprodução e/ou divulgação total ou parcial da presente obra, por qualquer meio convencional ou eletrônico, desde que citada a fonte.

FICHA CATALOGRÁFICA

Vilela, Marina Moscardini

Formulação à base de extrato de plantas desenvolvida para uso bucal: Avaliação da atividade antimicrobiana e da alteração de cor dental. Ribeirão Preto, 2015.

113p. : il. ; 30 cm

Dissertação de Mestrado, apresentada à Faculdade de Odontologia de Ribeirão - Preto/USP – Área de Concentração: Odontopediatria.

Orientador: De Rossi, Andiará

1. Epigalocatequina - 3 - galato; 2. Agente Antimicrobiano; 3. Clorexidina;
4. Alteração de cor dental

FOLHA DE APROVAÇÃO

Vilela MM. **Formulação à base de um extrato do chá verde desenvolvida para uso bucal: avaliação da atividade antimicrobiana e da alteração de cor dental.**

Dissertação apresentada à Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, para obtenção do Título de Mestre em Ciências. Área de Concentração: Odontopediatria.

Data da defesa: ____/____/____

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. _____

Julgamento _____ Assinatura _____

Prof. Dr. _____

Julgamento _____ Assinatura _____

Prof. Dr. _____

Julgamento _____ Assinatura _____

DADOS CURRICULARES

MARINA MOSCARDINI VILELA

- Nascimento** 20 de julho de 1990 – Leme/SP
- Filiação** Sebastião Apóstolo Vilela
Maria Aparecida Moscardini
- 2009-2012** Graduação em Odontologia
Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto – FORP/USP
- 2011-2011** Iniciação científica – Bolsista CNPq
Reabilitação Oral
Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto – FORP/USP
- 2012-2012** Iniciação científica – Bolsista FAPESP
Reabilitação Oral
Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto – FORP/USP
- 2012-2012** Aperfeiçoamento
Endodontia Clínica com ênfase em Rotatórios
Associação Paulista de Cirurgiões Dentistas Regional de Ribeirão Preto
- 2013-2013** Extensão Universitária
Odontopediatria Clínica
Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto – FORP/USP
- 2013-2015** Pós-Graduação (Mestrado) em Odontologia
Área de concentração: Odontopediatria
Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto – FORP/USP

*“A mente que se abre a uma nova idéia jamais voltará ao
seu tamanho original.”*

Albert Einstein

OFEREÇO ESTE TRABALHO

À Deus,

por sempre me conceder sabedoria nas escolhas dos melhores caminhos, coragem para acreditar, força para não desistir e proteção para me amparar.

DEDICATÓRIA

*Aos meus pais **Sebastião Apóstolo Vilela** e **Maria Aparecida Moscardini**, que sempre colocaram como objetivo de suas vidas a realização dos sonhos dos filhos. Obrigada por todo esforço, paciência, amor, carinho e sabedoria. O apoio e confiança que depositam em mim me dá força para seguir em frente e nunca desistir. Sem dúvidas, com vocês ao meu lado, conseguiria alcançar qualquer objetivo e concluir qualquer desafio. Tenho muito orgulho de ser filha de vocês.*

*Ao meu irmão **Lucas Moscardini Vilela**, por todos os momentos de alegria, companheirismo e cumplicidade. Obrigada pela torcida eterna, pelo apoio e pelo incentivo de sempre.*

*Ao meu namorado **Cristiano Lustiere Gomes** por ser meu porto seguro, pelas doses de incentivo diário e por ser essa pessoa maravilhosa. Agradeço a Deus pela sua presença na minha vida. Obrigada, meu amor, por tudo.*

*Às **crianças**, por serem o motivo da minha dedicação e por sempre me fazerem acreditar na pureza e na inocência do ser humano.*

AGRADECIMENTOS ESPECIAIS

*Com todo meu carinho, minha professora e minha amiga **Profª. Dra. Andriara De Rossi**, minha eterna gratidão pelo apoio em todos os momentos, por ter me acolhido e me recebido tão bem, pela paciência em me passar seus conhecimentos, pela amizade e por sempre acreditar em mim. Aprendi, com sua garra e determinação, que precisamos viver plenamente nossa vida profissional. Tenha a certeza de que você me incentivou a chegar até aqui e me instruiu a fazer sempre as melhores escolhas. Admiro a forma com que conduz sua vida acadêmica e científica. Saiba que você é um exemplo que sigo no meu projeto de vida, como ser humano e como pesquisadora.*

*Ao **Prof. Dr. Sérgio Luiz de Souza Salvador**, por ter me acolhido em seu laboratório com tanto carinho. Agradeço por acreditar em mim e na minha capacidade de aprender! Por ser tão gentil, atencioso e pelos ensinamentos tão valiosos. Agradeço à Deus por ter colocado pessoas como você ao meu lado nessa trajetória. Você é um exemplo de professor. Sempre levarei comigo seus conselhos e conhecimentos transmitidos. Você sempre será uma pessoa muito querida por mim.*

*À funcionária do Departamento de Microbiologia da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo **Marina Del Arco**, minha querida amiga, obrigada por tudo! Você sempre será especial pra mim. Não tenho palavras para expressar a gratidão por todo apoio, ajuda, atenção e ensinamentos. Sempre levarei comigo todos os momentos bons que passamos juntas. Obrigada por dividir suas experiências comigo e por estar sempre disposta a ajudar. Saiba que tenho uma admiração enorme por você e que estarei sempre ao seu lado.*

AGRADECIMENTOS

À Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, na pessoa do atual diretor Prof. Dr. Valdemar Mallet da Rocha Barros e da Vice-Diretora Prof^ª. Dr^ª. Prof^ª. Dr^ª. Léa Assed Bezerra da Silva.

À Coordenação do Curso de Pós-Graduação em Odontopediatria da Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, na pessoa da Coordenadora Prof^ª. Dr^ª. Léa Assed Bezerra da Silva e da Vice-Coordenadora Prof^ª. Dr^ª. Raquel Assed Bezerra da Silva.

À Prof^ª. Dr^ª. Aldevina Campos de Freitas, grande exemplo de dedicação, paciência, determinação e amor à profissão. Professora, muito obrigada pelos conhecimentos teóricos e clínicos transmitidos durante esta trajetória.

Aos Professores da Disciplina de Ortodontia da Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, Prof. Dr. Adílson Thomazinho, Prof. Dr. Fábio Lourenço Romano, Prof. Dr. José Tarcísio Lima Ferreira, Prof^ª. Dr^ª. Maria Bernadete Sasso Stuaní e Prof^ª. Dr^ª. Mírian Aiko Nakane Matsumoto, pela agradável convivência, pelas conversas atenciosas e pelos conhecimentos transmitidos.

Aos funcionários do Departamento de Clínica Infantil da Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto:

Dr. Francisco Wanderley Garcia de Paula e Silva, Dr^ª. Carolina Paes Torres Mantovani e Dr^ª. Marília Pacífico muito obrigada pela ajuda, pelas orientações nas clínicas e por estarem sempre disponíveis a colaborar com a minha aprendizagem. Agradeço pela convivência agradável e por dividirem experiências e conhecimentos.

Marco Antônio dos Santos, obrigada pela convivência agradável, pela atenção e por estar sempre disposto a ajudar.

Nilza Letícia Magalhães, obrigada pela participação nos trabalhos desenvolvidos durante esse período. Agradeço de coração por dividir suas experiências comigo, por estar sempre disposta a ajudar, pelas conversas e risadas. Você é muito querida por mim.

Fátima Aparecida Jacinto, obrigada pelas ajudas oferecidas e pelo apoio de sempre.

Filomena Leli Placciti, por sempre me receber com tanto carinho, pelas conversas e pela disposição em me ajudar. Agradeço a Deus por cruzar com pessoas como você na minha trajetória de vida.

Matheus Morelli Zanela, pela paciência, atenção e disponibilidade. Agradeço pelas conversas e principalmente pelas risadas. Você é muito querido! Agradeço pelo convívio agradável e pelo carinho.

Micheli Cristina Leite Rovanholo, pela dedicação, paciência, apoio, atenção e carinho durante todo o curso. Mi, você é uma pessoa maravilhosa. Agradeço de coração por tudo.

Benedita Viana Rodrigues e Fátima Aparecida Rizoli, pela atenção e apoio na Clínica de Pacientes Especiais. Agradeço pela forma amigável, simpática e alegre que sempre me receberam.

À funcionária do Departamento de Microbiologia da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo, Eliane Pereira Figueiredo, por todo apoio, carinho, atenção e amizade. Você é uma pessoa muito especial! Obrigada principalmente pelos momentos divertidos, que com certeza deixaram meus dias mais alegres.

À funcionária do Banco de Dentes da Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, Renata Aparecida Fernandes, pelo carinho, atenção e pela disposição em me ajudar todas as vezes em que estive próxima. Obrigada por me receber tão bem e por ser a pessoa ótima que é.

Aos funcionários da Clínica I da Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, José Aparecido Neves do Nascimento, Vera do Nascimento Scandelay e Karina Dadalt Quaglio, obrigada pela prontidão em me atender, pela alegre convivência, pelo apoio e carinho.

*À funcionária da Clínica III da Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, **Silva Helena Campos**, pela amizade, pelo carinho e por toda ajuda. Agradeço também por todas as conversas que sempre me fizeram muito bem. Agradeço a Deus por cruzar com pessoas como você na minha trajetória de vida.*

*Aos funcionários da Seção de Pós-Graduação da Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, **Isabel Cristina Galino Sola**, **Regiane Cristina Moi Sacilloto** e **Leandro Marin Silva**, pela atenção e por estarem sempre à disposição.*

*À secretária do Curso de Especialização em Ortodontia, **Rosemary Alves de Sã. Rose**, obrigada pela disponibilidade, atenção e pela formatação deste trabalho.*

Às minhas amigas e colegas de turma do Mestrado, por compartilhar ótimos momentos, por dividir experiências e dificuldades, pelo companheirismo e amizade.

Aos alunos do Programa de Pós-Graduação em Odontopediatria da Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, pela agradável convivência, pelas conversas divertidas e pelos momentos compartilhados.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Ensino Superior (CAPES), pelo suporte financeiro, fundamental para a realização deste trabalho.

À todos aqueles que participaram direta ou indiretamente para que este trabalho se tornasse realidade.

RESUMO

Vilela, MM. **Formulação à base de um extrato do chá verde desenvolvida para uso bucal: Avaliação da atividade antimicrobiana e da alteração de cor dental.** Ribeirão Preto, 2015. 113p. [Dissertação de Mestrado]. Ribeirão Preto: Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo; 2015.

Atualmente o digluconato de clorexidina (CHX) constitui o agente antimicrobiano de uso bucal mais utilizado na Odontologia devido ao seu amplo espectro de ação contra bactérias, fungos e vírus e efeito residual. No entanto, este agente apresenta efeitos colaterais quando utilizado por longo período, podendo causar coloração extrínseca nos dentes e restaurações, alteração no paladar, sensibilidade na língua e descamação das mucosas. Estes efeitos adversos conduzem à pesquisa de novas formulações. Entretanto, até o momento, nenhum agente antimicrobiano substituiu a clorexidina. Assim, o objetivo deste estudo foi desenvolver uma nova formulação antimicrobiana à base de um extrato de planta derivado do chá verde, a epigallocatequina-3-galato (EGCG), avaliar sua ação antimicrobiana contra microrganismos cariogênicos, *in vitro* e *in vivo*, e a possibilidade de alteração de cor dental, *in vitro*. A atividade antimicrobiana *in vitro* contra *S. mutans*, *S. sobrinus* e *L. casei* foi avaliada por meio da determinação da concentração inibitória mínima (CIM) e concentração bactericida mínima (CBM), e, posteriormente sua concentração antimicrobiana de uso clínico foi determinada *in vivo*, após seu uso por crianças com alto risco e atividade da doença cárie. A concentração de microrganismos cariogênicos foi determinada na saliva das crianças, antes e após a realização do bochecho em diferentes concentrações, até se obter a máxima ação antimicrobiana. A clorexidina a 0,12% (Periogard®) e a água destilada foram utilizadas como controle positivo e negativo, respectivamente. A possível alteração de cor dental foi avaliada na coroa de dentes decíduos e permanentes humanos anteriores recém-extraídos, por meio de espectrofotometria (Easy Shade) e obtenção dos valores absolutos de L*, a* e b* (Sistema CIELab). Foi determinada a cor inicial e após a realização de 1, 5, 10 e 30 simulações de bochechos com cada solução testada durante 1 minuto. Os resultados dos ensaios de CIM e CBM *in vitro* mostraram que a formulação de EGCG inibiu o crescimento de todos os microrganismos cariogênicos avaliados. A CIM de EGCG contra *S. mutans*, *S. sobrinus* e para o *L. casei* foi obtida nas concentrações de 125, 750 e 750 µg/mL, respectivamente. A CBM de EGCG contra o *S. mutans*, *S. sobrinus* e para o *L. casei* foi verificada nas concentrações de 250, 1000 e 1000 µg/mL, respectivamente. A CBM em comum entre os 3 microrganismos foi utilizada como concentração inicial para a avaliação da atividade antimicrobiana *in vivo*. A partir desse valor a concentração foi sendo dobrada até atingir o valor de 4000 µg/mL, que foi considerada a concentração de EGCG de uso clínico que causou redução da microbiota salivar cariogênica (86,48%) que mais se assemelhou à clorexidina (89,89%). A simulação de bochechos com a formulação de EGCG desenvolvida (4000 µg/mL) causou alteração no valor absoluto das coordenadas L*, a* e b* em dentes decíduos e permanentes, de forma semelhante à causada pela solução de clorexidina. A alteração dos valores absolutos de L* e b* foram reversíveis após a realização de profilaxia dental. Com base nas metodologias e nos resultados obtidos no presente estudo pode-se concluir que a formulação desenvolvida, à base de EGCG, apresenta efeito antimicrobiano contra microrganismos cariogênicos, *in vitro* e *in vivo*, e causa alteração de cor dental reversível.

Palavras-chaves: epigallocatequina-3-galato; clorexidina; agente antimicrobiano; alteração de cor dental

ABSTRACT

Vilela, MM. **Formulation based of green tea extract developed for oral use: Evaluation of antimicrobial activity and dental color change.** Ribeirão Preto, 2015. 113p. [Dissertação de Mestrado]. Ribeirão Preto: Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo; 2015.

Currently the digluconate of chlorhexidine (CHX) is the antimicrobial agent for oral use most often used in dentistry due to its broad spectrum of activity against bacteria, fungi and viruses, and residual effect. However, this agent has side effects when used for long periods, and may cause extrinsic staining on teeth and restorations, change in taste, tenderness in the language and peeling of the mucous membranes. These adverse events lead to research into new formulations. However, to date, no antimicrobial agent has replaced the chlorhexidine. The objective of this study was to develop a new antimicrobial formulation based of green tea extract, epigallocatechin-3-gallate (EGCG), evaluate their antimicrobial activity against cariogenic microorganisms *in vitro* and *in vivo*, and possibility of dental color change *in vitro*. The *in vitro* antimicrobial activity against *S. mutans*, *S. sobrinus* e *L. casei* was evaluated by determining the minimum inhibitory concentration (MIC) and minimum bactericidal concentration (MBC), and subsequently its antimicrobial concentration was determined in clinical use, after its use for children at high risk and activity of caries. The concentration of cariogenic microorganisms was determined in the saliva of children before and after performing the mouthwash at different concentrations to obtain maximum antimicrobial activity. The chlorhexidine 0.12% (Periogard®) and distilled water were used as positive and negative controls, respectively. The possible dental color change was evaluated on the crown of deciduous and permanent teeth freshly extracted human anterior by means of spectrophotometry (Easy Shade) and obtaining the absolute values of L *, a * and b * (CIELab system). The color was determined in the beginning and after the completion of 1, 5, 10 and 30 mouthwash simulations for 1 minute of each solution tested. *In vitro* results of MIC and CBM tests showed that formulation EGCG inhibited the growth of all cariogenic microorganisms evaluated similarly to chlorhexidine. The MIC of EGCG against *S. mutans*, *S. sobrinus* and *L. casei* was observed at concentrations of 125, 750 and 750 µg/ml, respectively. EGCG MBC against *S. mutans*, *S. sobrinus* and *L. casei* was observed at concentrations of 250, 1000 and 1000 µg/ml, respectively. The common CBM between the three microbes was used as initial concentration for the evaluation of the antimicrobial activity *in vivo*. From this value the concentration was being folded up to the value of 4000 µg/mL, which was considered the concentration of EGCG clinical use which caused reduction in salivary microbiota cariogenic (86.48%) that most resembled the chlorhexidine (89.89%). The simulation of mouthwash with the developed formulation EGCG (4000 µg/ml) caused change in the absolute value of the coordinates L *, a * and b * in deciduous and permanent teeth, similar to that caused by chlorhexidine . The changes of the absolute values of L* and b* were reversible after performing dental prophylaxis. Accordance with the procedures and the results obtained in this study it can be concluded that the formulation developed, based on EGCG, has antimicrobial effect against cariogenic microorganisms *in vitro* and *in vivo*, and causes reversible change dental color.

Key-words: epigallocatechin-3-gallate; antimicrobial agent; chlorhexidine; dental colour change.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	25
2 PROPOSIÇÃO	33
3 MATERIAL E MÉTODOS	37
4 RESULTADOS	55
5 DISCUSSÃO	75
6 CONCLUSÃO	85
REFERÊNCIAS	89
ANEXOS	105

Introdução

1 INTRODUÇÃO

Dentre as doenças infecciosas humanas mais prevalentes no mundo, destaca-se a cárie dental, que apresenta etiologia multifatorial, envolvendo fatores do hospedeiro, dieta e microbiota específica (Fejerskov e Kidd, 2007; Aldana et al., 2013; Kt et al., 2013; Pradeep e Hegde, 2013). A patogênese da cárie dental envolve várias etapas que vão desde a adesão bacteriana às superfícies dos dentes até a produção de ácidos decorrente da metabolização dos carboidratos, especialmente da sacarose presente na dieta, que pode resultar na perda mineral e estrutural do dente (Kt et al., 2013; Durso et al., 2014; Zhang, 2014). Dentre os principais agentes etiológicos envolvidos no início dessa doença em humanos destacam-se os estreptococos do grupo mutans (EGM): *Streptococcus mutans* e *Streptococcus sobrinus* (Dzink e Socransky, 1985; Loesche, 1986; Seneviratne et al., 2011), enquanto os *Lactobacilos ssp* constituem os principais envolvidos em sua progressão (Zhang, 2014). Os EGM constituem a espécie dominante no biofilme dental cariogênico e sua colonização da superfície dos dentes se deve a diferentes mecanismos. Dentre esses, estão a habilidade de sintetizar glucanos aderentes a partir da sacarose (Hamada e Slade, 1980; Staat et al., 1980) e a capacidade de sobreviver em meios criados pela topografia particular das superfícies dentais (Loesche, 1986).

A prevenção da doença cárie inclui a efetiva remoção do biofilme dental, por meio de métodos mecânicos, químicos ou a combinação dos mesmos, além do controle de fatores dietéticos, ambientais e sociais. A escovação regular é, sem dúvida, o método mais empregado para remoção mecânica do biofilme dental e, quando associada aos dentífricos fluoretados, oferece proteção adicional para reduzir a desmineralização e aumentar a remineralização do dente (Moran e Add, 1984; Frandsen, 1986; Moran et al., 1988; Arweiler et al., 2002; Davies, 2008; Tenuta e Cury, 2013). Entretanto, em crianças com alto risco e atividade da doença cárie, incluindo pacientes portadores de necessidades especiais, usuários de aparelhos ortodônticos ou pós-cirúrgicos, as dificuldades motoras e o modesto sucesso obtido na remoção de biofilme bacteriano por meio de procedimentos mecânicos, torna necessário o uso adicional de agentes antimicrobianos para melhor controle da microbiota cariogênica e até mesmo periodontopatogênica (Sjoblom et al., 1976; Asahi et al., 2014).

Vários agentes químicos foram sugeridos pela literatura ao longo dos tempos para uso como antimicrobiano bucal, como o triclosan (Jones et al., 2000; Nogueira-Filho et al., 2000; Ciancio, 2007; Davies, 2008; Davies et al., 2010; Prasanth, 2011; Maltz e Beighton, 2012; Ros-Llor e Lopez-Jornet, 2014), o cloreto de cetilpiridínio (Mankodi et al., 2005;

Stookey et al., 2005; Albert-Kiszely et al., 2007; Hu et al., 2009; Costa et al., 2013; Liu et al., 2013; Van Leeuwen et al., 2014) e os óleos essenciais (Charles et al., 2013; Parikh-Das et al., 2013; Pizzo et al., 2013; Cortelli et al., 2014; Haas et al., 2014; Van Leeuwen et al., 2014; Ros-Llor & Lopez-Jornet, 2014; Quintas et al., 2015). No entanto, atualmente o agente mais utilizado e mais efetivo na Odontologia é o digluconato de clorexidina (CHX) que é considerado o “gold standard” (Löue et al., 1976; Lang et al., 1986; Jones, 1997; Tenenbaum, 1999; Twetman, 2004; Mathur et al., 2011; Varoni et al., 2012; Jolly et al., 2013; Osso e Kanani, 2013; Pasich et al., 2013), devido ao seu amplo espectro de ação contra microrganismos aeróbios e anaeróbios (Rolla, 1975; Jones, 1997; Tenenbaum, 1999; Jolly et al., 2013; Osso e Kanani, 2013; Pasich et al., 2013). O efeito antimicrobiano da clorexidina é um resultado da natureza dicatiônica de sua molécula com afinidade especial às estruturas bucais, que permite ainda efeito residual, com liberação prolongada do agente (substantividade ou efeito residual), que proporciona persistência do efeito antimicrobiano (Lang et al., 1986; Jones, 1997; Mathur et al., 2011; García-Caballero et al., 2013). Além de seu efeito bactericida e bacteriostático contra bactérias Gram-positivas e Gram-negativas, fungos e vírus (Van Rijkom et al., 1996; Jones, 1997; Moshrefi, 2002; Mathur et al., 2011), a clorexidina é capaz de suprimir seletivamente o crescimento de microrganismos cariogênicos, em particular o *S. mutans* (Rolla e Melsen, 1975).

Embora a CHX apresente ação antimicrobiana comprovada na redução da microbiota salivar cariogênica (Lang et al., 1982; De Rossi et al., 2005; Teixeira et al., 2014) e periodontopatogênica (Lang et al., 1982; Lang et al., 1986; Quirynen et al., 2005; Osso e Kanani, 2013), esta substância apresenta efeitos colaterais quando utilizada por período prolongado (Parwani et al., 2013). Os efeitos indesejados da CHX são decorrentes de sua elevada toxicidade tecidual e incluem coloração extrínseca do dente, restaurações e língua (Löue, 1976; Jones, 1997; Mathur et al., 2011; Supranoto et al., 2015), descamação das mucosas, sensibilidade na língua com alteração na sensibilidade gustativa (Quirynen et al., 2005), além de produzir uma maior quantidade de cálculo supra-gengival (Löue et al., 1976; Lang et al., 1982), mesmo em baixas concentrações (0,12%). Estes efeitos, embora reversíveis, contra indicam sua utilização por período prolongado. No entanto, até o momento não existe um agente antimicrobiano ideal de uso bucal que apresente alta capacidade antimicrobiana, efeito residual e ausência de toxicidade ou efeitos colaterais.

Atualmente os extratos à base de plantas têm sido propostos como alternativa ao tratamento de variadas doenças infecciosas por apresentar ação antimicrobiana (Allaker e Douglas, 2009; Mehta et al., 2013; Ntie-Kang et al., 2013; Yousaf et al., 2014; Lee e Tan, 2015). O chá verde, originário da *Camellia sinensis*, tem se destacado dentre os agentes

fitoterápicos, por apresentar comprovadas propriedades na prevenção e tratamento de doenças cardiovasculares, cancerosas, neurodegenerativas e imunológicas (Nagle et al., 2006; Hodgson e Croft, 2010; Suzuki e Isemura, 2013; Tarahovsky et al., 2014; Fang et al., 2015; Tenore et al., 2015). O chá verde tem muitos compostos biologicamente ativos, como polifenóis e catequinas (flavonóides), que constituem a maioria dos sólidos solúveis como epigallocatequina-3-galato (EGCG), epigallocatequina (EGC), epicatequina galato (ECG) e epicatequina (EC) (Yousaf et al., 2014). No entanto seu componente mais ativo biologicamente é a EGCG (Wang et al., 2014), que constitui mais de 50% dos polifenóis presentes (Yousaf et al., 2014).

Muitos estudos comprovam que os efeitos do chá verde na prevenção e tratamento de doenças decorrem na verdade da presença da EGCG que apresenta comprovada ação antioxidante (Yang et al., 1998; Anghileri e Thouvenot, 2000; Wen et al., 2013; Aslan et al., 2014; Saito et al., 2014), anti-inflamatória (Yang et al., 1998; Nakanishi et al., 2010; Uchiyama et al., 2013; Wen et al., 2013; Aslan et al., 2014; Zhou et al., 2014), antimicrobiana (Ikigai et al., 1993; Blanco et al., 2003; Taylor et al., 2005; Jeon et al., 2014), anti-carcinogênica (Yang et al., 1998; Suzuki e Isemura, 2013; Zhou et al., 2014; Wang et al., 2014; Yousaf et al., 2014; Butt et al., 2015), anti-hipertensiva (Basu e Lucas, 2007; Yousaf et al., 2014) e regeneradora (Sinha et al., 2014). Além de apresentar elevado espectro de ação contra bactérias Gram-positivas e Gram-negativas (Hamilton-Miller, 2001) a EGCG apresenta baixa toxicidade (Novy et al., 2013) e compatibilidade tecidual (Ferreira, 2015).

Na Odontologia, o uso da EGCG vem sendo sugerido no tratamento de reabsorções de tecidos mineralizados, como em doenças periapicais (Ferreira, 2013) e periodontais (Kudva et al., 2011; Jung et al., 2012; Narotzki et al., 2012; Asahi et al., 2014), ou mesmo na prevenção da gengivite (Jenabian et al., 2012) e regeneração de alvéolos ao redor de implantes (Shin et al., 2014). Estudos *in vitro* revelam que os polifenóis do chá verde apresentam eficácia antimicrobiana contra grande parte de microrganismos endodontopatogênicos (Horiba et al., 1991), como a *E. fecalis* (Prabhakar et al., 2010), e periodontopatogênicos, como a *P. gingivalis* (Jung et al., 2012; Asahi et al., 2014). Por apresentar biocompatibilidade a EGCG também foi sugerida como meio para a conservação de dentes avulsionados após traumatismos, mantendo a vitalidade das células do ligamento periodontal (Hwang et al., 2011; Jung et al., 2011; Ghasempour et al., 2015).

Estudos realizados *in vitro* também sugerem que a EGCG apresente propriedades anticariogênicas em função de sua ação antimicrobiana contra *S. mutans* e *S. sobrinus* (Sakanaka et al., 1989; Ferrazzano et al., 2011; Tamura et al., 2011; Xu et al., 2011; Anita

et al., 2014; Sarin et al., 2015). Essa ação decorre da habilidade da EGCG em impedir a aderência bacteriana ao dente através da inibição da enzima glicosiltransferase dos estreptococos (Otake et al., 1991; Subramaniam et al., 2012; Jung et al., 2012; Cai et al., 2013) e da alfa amilase salivar, inibindo a formação de carboidratos fermentáveis envolvidos na formação da cárie dental (Hara et al., 2012; Narotzki et al., 2012). Os poucos estudos realizados *in vivo* que sugerem os efeitos antimicrobianos do chá verde contra *S. mutans* foram realizados em modelos experimentais, como ratos e camundongos, submetidos à ingestão sistêmica de todos seus extratos (Otake et al., 1991; Hamilton-Miller, 2001). Apenas 3 estudos foram encontrados avaliando o efeito local do chá verde realizado por meio do bochecho em humanos adultos, mostrando que este extrato pode reduzir o pH do biofilme dental (Hirasawa et al., 2006) e o número de *S. mutans* (Ferrazano et al., 2011), de maneira semelhante à clorexidina (Neturi et al., 2014). No entanto nenhuma investigação foi encontrada avaliando o efeito tópico de seu principal extrato bioativo isolado, a EGCG, ou propondo o uso de uma formulação à base de EGCG para uso bucal, que associe máximo efeito antimicrobiano contra todas espécies cariogênicas e mínimos efeitos colaterais.

Além dos efeitos antimicrobianos, em condições de erosão e abrasão dentinária, a EGCG também pode impedir a degradação da matriz orgânica desmineralizada por atuar na inibição de metaloproteinases, que pode reduzir a perda progressiva de dentina de forma semelhante à clorexidina (Kato et al., 2009; Magalhães et al., 2009). O tratamento dentinário com EGCG antes da aplicação do agente adesivo também pode preservar as propriedades adesivas semelhante à clorexidina (Santiago et al., 2013). Em estudo *in vitro*, dentes que receberam restaurações em resina composta imediatamente após clareamento dental, a aplicação de uma solução a base de EGCG aumentou a resistência da resina composta (Khamverdi et al., 2013). Devido à sua ação antimicrobiana e inibidora da degradação de colágeno, esse extrato já foi sugerido para ser incorporado em materiais odontológicos, tais como, adesivo dentinário (Du et al., 2012), resinas compostas (Mankovskaia et al., 2013), cimento de ionômero de vidro (Hu et al., 2013) e dentifrícios (Maruyama et al., 2011; Hrishi et al., 2015). Sugere-se ainda que o chá verde e a EGCG estimulem os mecanismos de defesa da cavidade bucal, oferecendo maior proteção epitelial contra mecanismos de estresse oxidativo (Narotzki et al., 2013), efeito antiinflamatório e anticarcinogênico, atuando na prevenção e tratamento dos diferentes tipos de câncer bucal (Ho et al., 2007; Chen et al., 2011).

Sabe-se que produtos dietéticos e químicos podem causar alterações na cor do dente, de acordo com a frequência e período de exposição (Moreira et al., 2012). A alteração de cor é resultado de interação física e química entre os tecidos dentais e o agente causador

da pigmentação, o qual pode ser intrínseco ou extrínseco. Em estudo anterior, realizado por nosso grupo de pesquisa, a aplicação intracanal de EGCG não alterou a cor da coroa dental por um período de até 21 dias de utilização (Ferreira, 2013). No entanto, considerando que o chá é uma bebida com potencial de causar alteração de cor extrínseca em elementos dentários (Attin et al., 2003) torna-se necessária a avaliação da possível alteração de cor causada em dentes decíduos e permanentes após a aplicação tópica da solução de EGCG na coroa dos dentes.

Diante do exposto, verifica-se que as propriedades antimicrobianas, anti-inflamatórias, antioxidantes, antierosivas e anticancerígenas da EGCG, já comprovadas na prevenção e tratamento de diferentes doenças, também poderiam desempenhar papel como agente de uso tópico na cavidade bucal. No entanto, até o momento nenhum estudo propôs a utilização de uma formulação à base de EGCG para uso colutório com finalidade anticariogênica.

Proposição

2 PROPOSIÇÃO

Objetivo geral:

Desenvolver uma formulação à base de EGCG para uso colutório, avaliar sua ação antimicrobiana contra microrganismos cariogênicos e o possível manchamento dental.

Objetivos específicos:

- Desenvolver uma formulação à base de EGCG para uso colutório;
- Determinar *in vitro* a ação antimicrobiana da formulação EGCG contra microrganismos cariogênicos (*S. mutans*, *S. sobrinus* e *Lactobacillus casei*), determinando a concentração inibitória mínima e concentração bactericida mínima;
- Avaliar *in vivo* a possível interação da formulação de EGCG com o ambiente bucal bem como definir a concentração ideal de uso que apresente máxima ação antimicrobiana contra microrganismos cariogênicos (*S. mutans*, *S. sobrinus* e *Lactobacillus casei*), em crianças portadoras de alto risco e alta atividade da doença cárie;
- Determinar o efeito da formulação de EGCG na cor da coroa de dentes decíduos e permanentes humanos extraídos, em diferentes períodos de tempo;
- Avaliar se a alteração de cor dental é reversível após a realização de profilaxia dental.

Material e **M**étodos

3 MATERIAL E MÉTODOS

Reagentes e Soluções

Foi utilizada a Epigallocatequina-3-galato (EGCG) derivada do chá verde (E4143 – Epigallocatechin gallate from Green tea - Sigma Aldrich Co., St. Louis, MO, USA), disponível em partículas de 5 μm , apresentadas no estado sólido. Sua estrutura química ($\text{C}_{22}\text{H}_{18}\text{O}_{11}$) está ilustrada na Figura 1.

Figura 1. Estrutura química da EGCG ($\text{C}_{22}\text{H}_{18}\text{O}_{11}$), massa molecular 458, 37 g/mol.

A solução de EGCG foi manipulada em água destilada, de acordo com instruções do fabricante (Anexo A).

3.1 ATIVIDADE ANTIMICROBIANA *IN VITRO*

Os estudos para determinação da ação antimicrobiana da EGCG, *in vitro* e *in vivo*, foram realizados no Laboratório de Microbiologia do Departamento de Análises Clínicas, Toxicológicas e Bromatológicas da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo (FCFRP-USP), com a gentil colaboração do *Prof. Dr. Sérgio Luiz de Souza Salvador* e apoio técnico da *Marina Constante Gabriel Del Arco*.

3.1.1 Microrganismos

As cepas bacterianas indicadoras utilizadas no presente estudo foram adquiridas da coleção americana *American Type Culture Collection* - ATCC (Manassas, Virginia, EUA). A

atividade antimicrobiana da EGCG foi avaliada frente aos microrganismos cariogênicos *Streptococcus mutans* (ATCC 25175), *Streptococcus sobrinus* (ATCC 33478) e *Lactobacillus casei* (ATCC 11578). Os microrganismos foram gentilmente cedidos pelo Prof. Dr. Sérgio Luiz de Souza Salvador (FCFRP-USP).

Os microrganismos *S. mutans* e *S. sobrinus* foram mantidos em meio Tio's (Thioglycollate Medium w/o dextrose or indicator, BD, DIFCO, New Jersey, USA), na temperatura de 37°C, em atmosfera de microaerofilia, durante 72 horas e 48 horas antes do experimento foram cultivados em caldo BHI (Brain Heart Infusion - BD – DIFCO, New Jersey, USA) na temperatura de 37°C, em atmosfera de microaerofilia. O microrganismo *L. casei* foi mantido e cultivado em meio BHI, na temperatura de 37°C, em atmosfera de microaerofilia, durante 48 horas (Tabela 1).

Após o desenvolvimento dos microrganismos, os inóculos foram padronizados por meio de espectrofotometria a 625nm (Espectrofotômetro AJX 1000, Micronal S.A, São Paulo, Brazil). As suspensões dos microrganismos foram ajustadas até atingir a densidade óptica (D.O) equivalente ao padrão de turbidez 1/2 Escala Mc Farland (Becton, Dickson and Company, EUA), correspondente à aproximadamente $1,5 \times 10^8$ células/mL. A seguir, foram efetuadas 2 diluições para atingir a concentração de $1,5 \times 10^6$ células/mL, que corresponde ao encontrado na cavidade bucal de pacientes portadores de alta atividade da doença cárie ("mutans milionários").

Tabela 1. Microrganismos testados, origem, densidade óptica, meio de cultivo e incubação.

Microrganismos testados	Origem	Densidade óptica $\lambda=625\text{nm}$	Meio de cultivo	Incubação
<i>S. mutans</i>	ATCC 25175	0,186	Tio's caldo/BHI caldo	Microaerofilia
<i>S. sobrinus</i>	ATCC 33478	0,175	Tio's caldo/BHI caldo	Microaerofilia
<i>L. casei</i>	ATCC 11578	0,148	BHI ágar/BHI caldo	Microaerofilia

3.1.2 Determinação da concentração inibitória mínima (CIM)

A determinação da concentração inibitória mínima (CIM) da EGCG foi realizada pela técnica de microdiluição em caldo BHI, utilizando microplacas de cultivo de 96 cavidades de fundo côncavo (Plast Bio, Curitiba, PR, Brasil), de acordo com o preconizado por Eloff (1998). A CIM da EGCG sobre diferentes microrganismos cariogênicos foi definida como a menor concentração de EGCG que visivelmente inibiu o crescimento bacteriano (Rahman et al., 2004).

A formulação experimental utilizada foi a solução aquosa de EGCG, na concentração inicial de 4000µg/mL (6mg de EGCG em 1,5mL de água destilada esterilizada). Dessa solução foram feitas diluições com água destilada esterilizada até obter as seguintes concentrações: 1000µg/mL, 750 µg/mL, 500µg/mL, 250µg/mL, 125µg/mL, 62,5µg/mL, 31,25µg/mL, selecionada com base em estudos anteriores (Xu et al., 2012; Mankovskaia et al., 2013).

Como controle positivo foram utilizadas cepas bacterianas para comprovar a viabilidade do microrganismo-teste e como controle de esterilidade foram utilizadas o meio BHI isolado, a água destilada e a concentração inicial de EGCG para verificar que ambos inicialmente se encontravam esterilizados excluindo qualquer possibilidade de contaminação por outros tipos de microrganismos. Nos poços da água destilada e de EGCG foram adicionados BHI para dar condições de possível crescimento bacteriano, devido aos nutrientes do meio. Os grupos avaliados estão listados na Tabela 2.

Tabela 2. Grupo experimental, controle positivo e controle de esterilidade da avaliação da atividade antimicrobiana *in vitro*

Grupo	Material	Fabricante
Experimental	Epigallocatequina-3-galato (EGCG) + água destilada	Sigma Aldrich Co.
Controle positivo	Cepas bacterianas adquiridas da coleção americana <i>American Type Culture Collection - ATCC</i>	FCFRP-USP
Controle de esterilidade	Meio de cultura (BHI) isolado +BHI Água destilada esterilizada + BHI Solução inicial EGCG+ BHI	FCFRP-USP

Foram dispostas 3 microplacas no fluxo laminar, uma referente a cada microrganismo e os componentes foram adicionados a cada poço da placa por meio de pipetas. Cada poço foi preenchido com 200 µL das soluções. A composição de cada poço está ilustrada na Figura 2.

Figura 2. Esquema ilustrativo da disposição dos grupos avaliados no estudo antimicrobiano, realizado em microplacas de cultivo de 96 cavidades.

As microplacas foram incubadas em condições de microaerofilia durante 72 horas na temperatura de 37°C. Após o tempo de incubação, foi realizada a primeira verificação visual do crescimento bacteriano. A ausência de turvação do meio indica ausência de crescimento bacteriano. Para confirmação, foi adicionado 30 µL do revelador resazurina (Resazurin sodium salt powder, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) a cada poço para detecção da mudança de cor das soluções, que reflete o metabolismo bacteriano ativo. A mudança de cor de azul para rosa indica metabolização da resazurina pela bactéria e portanto crescimento bacteriano. A resazurina foi preparada a 20% (2mg de resazurina em 10 mL de água destilada estéril) e foi armazenada em geladeira por no máximo 1 semana.

Foram realizadas leituras da CIM por meio da verificação visual do crescimento bacteriano. Para interpretação dos resultados foi considerado CIM a inibição total do crescimento microbiano, onde não houve mudança de cor do revelador.

3.1.3 Determinação da concentração bactericida mínima (CBM)

A concentração bactericida mínima (CBM) da EGCG sobre diferentes microrganismos cariogênicos foi definida como a menor concentração de EGCG que causou a morte do inóculo bacteriano utilizado.

Após a incubação das microplacas, foi realizada a determinação da CBM. Alíquotas de 10 µL foram retiradas de cada um dos poços contendo EGCG e transferidas por meio de pipetas para as placas de Petri (90x15 mm) contendo ágar com BHI suplementado com sangue. Foram utilizadas alças bacteriológicas para o plaqueamento das amostras. A leitura foi realizada após a incubação das placas a 37°C por 24 horas. O surgimento de colônia bacteriana para uma determinada concentração indicou que esta não foi capaz de matar 99,9% ou mais do inóculo bacteriano utilizado (Bosio et al., 2000).

3.2 ATIVIDADE ANTIMICROBIANA *IN VIVO*

Previamente à sua execução, o presente estudo foi submetido à apreciação pelo Comitê de Ética em Pesquisa Envolvendo Seres Humanos da Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, tendo sido aprovado (Processo CAAE nº 45863115.5.0000.5419 – Anexo B). Foi obtido o termo de consentimento livre e esclarecido dos responsáveis e o termo de assentimento da criança (Anexo C).

Para avaliação da atividade antimicrobiana da formulação de EGCG *in vivo* e determinação da concentração ideal de uso clínico foram testadas formulações com concentrações partindo da CBM obtida no estudo *in vitro* até atingir o efeito que mais se

aproximasse da clorexidina. Como controle negativo foi utilizada água destilada esterilizada e como controle positivo foi utilizada a clorexidina a 0,12 % (Periogard® sem álcool, Colgate-Palmolive Company, São Paulo, SP, Brasil).

3.2.1 Procedimentos Clínicos

Foram selecionadas 10 crianças que procuraram atendimento na Clínica de Odontopediatria da Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto (FORP- USP), de ambos os sexos, na faixa etária de 6 a 12 anos, com boa saúde geral, evidenciada após anamnese detalhada, e que não relataram o uso de qualquer solução antisséptica ou antibiótico nos últimos 3 meses. As crianças não foram submetidas a tratamento odontológico anterior e apresentavam alto risco e atividade de cárie dental (com no mínimo 3 lesões de cárie ativa), que foi determinado após o preenchimento de ficha específica utilizada pela Disciplina de Odontopediatria FORP-USP (Anexo D), com base em critérios dietéticos, clínicos e anamnésicos. Além disso, nos critérios microbiológicos, as crianças deveriam apresentar contagem inicial de microrganismos cariogênicos de no mínimo 10^6 UFC/mL de saliva. Após a coleta da saliva, as crianças receberam tratamento odontológico preventivo, restaurador e de manutenção, na clínica de Odontopediatria da FORP/USP.

Para a quantificação inicial dos níveis salivares dos EGM (*Streptococcus mutans* e *Streptococcus sobrinus*) e *Lactobacillus casei*, foram coletados aproximadamente 2 mL de saliva não estimulada, depositada em tubo tipo falcon, fundo cônico, graduado e esterilizado, de 50 mL (Kasvi, China), contendo pérolas de vidro. Os pacientes foram devidamente orientados a realizar esse procedimento evitando, ao máximo, o contato direto dos lábios com a porção superior do tubo. Durante este período, os tubos permaneceram fechados, sendo a tampa removida somente no ato da coleta e recolocada logo em seguida. Logo após, as crianças realizaram 1 bochecho com 3 mL da solução por 1 minuto e após 10 minutos foi feita uma nova coleta da saliva, seguindo o mesmo protocolo (De Rossi et al., 2005). Cada grupo, experimental (nas 3 concentrações avaliadas) e controles (clorexidina e água destilada), foi composto por 2 crianças.

As amostras de saliva foram armazenadas em caixa térmica de isopor contendo gelo e enviadas imediatamente ao Laboratório de Microbiologia da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, para processamento microbiológico e determinação dos níveis salivares de estreptococos do grupo mutans e lactobacilos antes (baseline) e 10 minutos após a realização do bochecho (De Rossi et al., 2005).

3.2.2 Processamento microbiológico

A- Processamento das amostras

As amostras de saliva foram homogeneizadas em aparelhos Mixtron (Toptronix, São Paulo, SP, Brasil) por 2 minutos, em velocidade máxima e, a seguir, foram submetidas à diluição decimal seriada (de 10^{-1} a 10^{-6}) usando como eluente a solução salina tamponada fosfatada (PBS), pH 7.0, esterilizada. Para a diluição foram utilizadas alíquotas correspondentes a 0,1 mL (100 μ L) da saliva pura em PBS (900 μ L por diluição) (Figura 3).

B- Semeadura das amostras

Foram depositadas 0,05 mL (50 μ L) de cada diluição no centro de placas de Petri (10x60mm) contendo os meios de cultura específicos para os microrganismos. A semeadura foi feita em duplicata, referente às placas de antes e depois da realização do bochecho.

Os meios de cultura utilizados foram: Ágar Sacarose Bacitracina - SB₂₀ modificado por Azevedo (1988), seletivo para estreptococos do grupo mutans, e Ágar Rogosa SL (HiMedia, HiMedia Laboratories, Mumbai, Índia), seletivo para lactobacilos. Foi efetuada a distribuição uniforme com bastão angulado em L esterilizado (Figura 3).

Figura 3. Esquema ilustrativo da metodologia utilizada para avaliação da atividade antimicrobiana *in vivo*. Diluição decimal seriada da saliva e semeadura das amostras nos meios de cultura seletivos para cada espécie.

C- Preparo do meio de cultura SB₂₀

O meio de cultura SB₂₀ modificado, seletivo para estreptococos do grupo mutans, foi preparado como preconizado por Azevedo (1988) e Torres et al. (1993), como listado na Tabela 3.

Tabela 3. Composição do meio de cultura SB₂₀ modificado, utilizado para o crescimento de estreptococos do grupo mutans.

Componente	Fabricante	Quantidade
Casitone	Difco, BD, Sparks, MD, EUA	15,0g
Extrato de levedura	Difco, BD, Sparks, MD, EUA	5,0g
L-cisteína	Synth, Labsynth, Diadema, SP, Brasil	0,2g
Sulfito de sódio	Synth, Labsynth, Diadema, SP, Brasil	0,1g
Acetato de sódio	Synth, Labsynth, Diadema, SP, Brasil	20,0g
Sacarose (Açúcar cristal)	Synth, Labsynth, Diadema, SP, Brasil	200,0g
Agar-agar	Difco, BD, Sparks, MD, EUA	15,0g
Água destilada esterilizada	FCFRP-USP	1000,0mL

Por meio da utilização de uma balança elétrica, os componentes foram pesados e divididos em 2 balões volumétricos. À seguir, foi colocado uma porção da água destilada para dissolução mediante homogeneização manual. O restante da água foi adicionado lentamente para remover resquícios de agar depositados nas paredes dos balões. Em seguida, foram vedados com algodão, envoltos em papel kraft, identificados e autoclavados por 20 minutos, na temperatura 120°C. Após o resfriamento até a temperatura aproximada de 50°C foi adicionado e homogeneizado 1,0% da solução de bacitracina (0,0033g em 10 mL de água destilada estéril). Assepticamente, o meio obtido foi vertido em placas de Petri (10x60mm) esterilizadas. Após a solidificação, as placas foram mantidas em refrigerador, a 4°C, sendo utilizadas no período máximo de 7 dias.

D- Preparo do meio de cultura Ágar Rogosa SL

O meio de cultura Ágar Rogosa SL foi preparado seguindo instruções do fabricante, conforme listado na Tabela 4.

Tabela 4. Composição do meio de cultura Ágar Rogosa SL, utilizado para o crescimento de lactobacilos.

Componente	Fabricante	Quantidade
Ágar rogosa SL	HiMedia, HiMedia Laboratories, Mumbai, India	75,0g
Ácido acético glacial	Synth, Labsynth, Diadema, SP, Brasil	1,32mL
Água destilada estéril	FCFRP-USP	1000,0mL

Por meio da utilização de uma balança elétrica, o meio Ágar Rogosa SL foi pesado e dividido em 2 balões volumétricos. Em seguida, foi adicionado água destilada esterilizada (500mL em cada). A dissolução foi feita mediante aquecimento com freqüente agitação manual até fervura. Logo após, foi adicionado ácido acético glacial e novamente levado à fervura. Desta forma esse meio não precisou ser autoclavado, estando pronto para ser vertido em placa. Assim assepticamente, o meio obtido foi vertido em placas de Petri (10x60mm) estéreis. Após a solidificação, as placas foram mantidas em refrigerador, na temperatura de 4°C, sendo utilizadas no período máximo de 7 dias.

E- Incubação das amostras

Após a distribuição das amostras, estas foram incubadas em atmosfera de microaerofilia (método da chama de vela), durante 72 horas, na temperatura de 37°C.

F- Identificação perfunctória e contagem das colônias com características morfológicas

Decorrido o período de incubação, foi efetuada a contagem das unidades formadoras de colônia (UFC), com o auxílio de estereomicroscópio (Nikon, Tóquio, Japão). A identificação perfunctória foi realizada observando-se características morfológicas das UFC (Saravia et al., 2011), que foram descritas da seguinte forma:

1. *S. mutans*: colônias com cor branco-acizentada ou creme amarelada, superfície granular semelhante à vidro moído, parecendo fragmentadas a partir do centro e podendo apresentar ou não uma gotícula cintilante de polissacáride extracelular no topo. As colônias, algumas vezes mucóides, são geralmente duras e se esmigalham quando tocadas com agulha de platina, podendo, também, apresentar-se circundadas por um halo incolor, visível a olho nu (Davey e Rogers, 1984; Azevedo, 1988);
2. *S. sobrinus*: colônias firmes, opacas, que não se desintegram quando tocadas com agulha de platina, deslocando-se facilmente e apresentando com freqüência, uma gotícula cintilante de polissacáride no topo. Tais colônias são circundadas por um halo branco leitoso, visível a olho nu (Davey e Rogers, 1984; Azevedo, 1988);
3. *L. casei*: colônias identificadas com tamanho médio a grande, cor branco leitoso, redonda, convexa, com borda e superfície lisa (De Man et al., 1960; Ramesh et al., 2013).

Foram realizadas provas bioquímicas para a confirmação da identificação das espécies. As colônias foram transferidas para tubos contendo o meio Tio's, incubados na

temperatura de 37°C, por 24 horas, para biotipagem. Foram efetuadas as seguintes provas bioquímicas de acordo com Shklair e Keene (1974): fermentação do manitol, sorbitol, rafinose e melibiose, resistência à bacitracina, hidrólise de esculina e produção de peróxido de hidrogênio (Whittenbury, 1964), segundo modificações propostas por Ito et al. (1993), e hidrólise de arginina.

G- Cálculo do percentual de redução

Através da contagem dos microrganismos, foi obtido o valor total de UFC/mL de saliva, utilizando a fórmula:

$$\text{UFC/mL} = \frac{\text{Número de Microrganismo} \times \text{Fator de Diluição}}{\text{Volume (mL)}}$$

Em seguida, foi realizado o cálculo do percentual de redução dos microrganismos através da fórmula:

$$\% \text{ redução} = \frac{\text{UFC A} - \text{UFC D}}{\text{UFC A}} \times 100$$

Sendo:

UFC A: Contagem de unidade formadora de colônia na placa antes do bochecho

UFC D: Contagem de unidade formadora de colônia na placa depois do bochecho

3.3 ALTERAÇÃO DE COR DENTAL *IN VITRO*

3.3.1 Preparo dos dentes decíduos e permanentes

Foram selecionados dentes decíduos e permanentes, anteriores, superiores e inferiores, recém-extraídos de humanos, apresentando a coroa hígida e mantidos em água destilada. Após a realização da profilaxia dental com pedra pomes e água, os dentes permanentes foram submetidos à secção transversal para separação da raiz, a 2 mm além da junção cimento-esmalte, com o uso de discos de carburundum. Os dentes decíduos não foram submetidos à realização deste procedimento devido ao avançado processo de reabsorção fisiológica da raiz. A região cervical de todos os dentes foi selada com resina composta (Figura 4).

Figura 4. Esquema ilustrativo do preparo dos dentes permanentes para o estudo de alteração de cor, incluindo profilaxia, secção transversal das raízes, preenchimento cervical com resina composta, inserção dos dentes na matriz individualizada para leitura de cor padronizada e simulação do bochecho por meio de um agitador.

Para padronização das leituras de cor na mesma região da coroa, foi confeccionada uma matriz individualizada utilizando como base um suporte plástico com tampa. Sobre a base foi inserido resina acrílica junto aos dentes para sua imobilização (Figura 5).

Figura 5. Matriz individualizada utilizada para a leitura de cor de dentes decíduos (superior) e permanentes (inferior)

3.3.2 Divisão dos grupos experimentais

Após o preparo dos dentes decíduos e permanentes, estes foram aleatoriamente divididos em 3 grupos, sendo um grupo experimental com 10 dentes (EGCG a 4000µg/mL), um grupo controle positivo com 10 dentes (clorexidina a 0,12%, (Periogard® sem álcool) e um grupo controle negativo com 5 dentes (água destilada), listados na Tabela 5.

Tabela 5. Grupos experimentais e controles, material utilizado e números de dentes utilizados na análise de alteração de cor dental.

Grupos	Material	Dentes decíduos	Dentes permanentes
Experimental	Epigallocatequina-3-galato (EGCG) + água destilada X%	10	10
Controle positivo	Clorexidina 0,12% (Periogard®)	10	10
Controle negativo	Água destilada	5	5

3.3.3 Análise da Cor dos Dentes

A cor da coroa dos dentes foi determinada com auxílio do espectrofotômetro digital VITA Easyshade (Wilcos Brasil Indústria e Comércio Ltda, SP, Brasil) (Figura 6) no Laboratório do Departamento de Materiais Dentários e Prótese, por gentileza da Profa. Dra. Fernanda de Carvalho Panzeri Pires-de-Souza.

Figura 6. Aparelho VITA Easyshade utilizado para leituras de cor dental

O padrão de observação, simulado pelo colorímetro espectrofotométrico, seguiu o sistema CIELab recomendado pela CIE (Comission Internationale de l'Éclairage). Este consiste de dois eixos a^* e b^* , que possuem ângulos retos e representam a dimensão de

matiz e saturação das cores verde-vermelha e azul-amarela, respectivamente. O terceiro eixo, L^* , representa a luminosidade (branco-preto) e é perpendicular ao plano a^*b^* . Com este sistema as cores são determinadas nas coordenadas L^* , a^* e b^* (Figura 7).

Figura 7. Sistema de coordenadas de cores de CIE $L^*a^*b^*$.
(Fonte: disenoypreimpresionmozadr.wordpress.com)

As leituras de cor dos dentes foram realizadas antes da realização da primeira simulação de bochecho (cor inicial) e após 1, 5, 10, 30 simulações realizadas com duração de 1 minuto com as 3 diferentes soluções. Para a simulação, os frascos contendo os dentes e as soluções foram mantidos sob agitação (Incubadora Shaker com Plataforma Universal – Marconi) na velocidade de 300 rpm. As medições foram sempre efetuadas no mesmo ambiente, por um único operador, previamente calibrado. Após cada bochecho os dentes foram imersos em água destilada e secos com papel absorvente para realização da leitura. Para a correta leitura, os dentes foram colocados na matriz sobre um fundo branco padrão. Foram realizados orifícios na tampa do suporte plástico com broca minicut para auxiliar no posicionamento do aparelho de leitura. Os dentes tiveram sua cor avaliada no terço médio da coroa, onde o feixe de luz do aparelho era sempre direcionado na mesma região, permitindo uma padronização na realização das leituras (Figura 8).

Figura 8. Imagem representativa da leitura da cor dental em dentes decíduos utilizando o VITA Easy Shade sobre a matriz individualizada com fundo branco padrão.

Os valores absolutos de L^* , a^* e b^* foram obtidos a partir de três leituras de cada amostra, sendo o valor médio considerado resultado final.

3.3.4 Análise da Reversibilidade de Alteração na Cor dos Dentes

Para a análise da reversibilidade na alteração de cor, causada pela nova formulação de EGCG, novas leituras de cor foram realizadas antes da realização de bochechos simulados (cor inicial), após a simulação de 30 bochechos e após a realização de profilaxia dental realizada com escovas de Robson (Preven Indústria e comércio de produtos odontológicos, Paraná, Brasil) e pasta profilática (Herjos, Vigodent, Rio de Janeiro, Brasil), durante 1 minuto. A cor da coroa dos dentes foi determinada com auxílio do espectrofotômetro digital VITA Easyshade, utilizando o mesmo protocolo de leitura de cor citado anteriormente. Este estudo foi realizado apenas em dentes decíduos ($n=5$ dentes) e a solução de EGCG foi avaliada apenas na concentração final obtida para uso clínico.

3.5 ANÁLISE ESTATÍSTICA

O percentual de redução microbiana *in vivo* foi realizado por meio da análise de variância (one-way ANOVA) seguida do pós-teste de Tukey. Os resultados de alteração de cor dental foram submetidos à análise de variância (one-way ANOVA) com medidas repetidas, seguida do pós-teste de Dunnet, utilizando os valores absolutos de L^* , a^* e b^* . Os dados foram analisados usando-se o programa estatístico Graph Pad Prism 4 (Graph Pad Software Inc, San Diego, CA, EUA), com intervalo de confiança de 95%.

Resultados

4 RESULTADOS

4.1 ATIVIDADE ANTIMICROBIANA *IN VITRO*

4.1.2 Determinação da concentração inibitória mínima (CIM)

Os ensaios de CIM *in vitro* mostraram que a formulação de EGCG inibiu o crescimento de todos os microrganismos cariogênicos avaliados (*S. mutans*, *S. sobrinus* e *L. casei*). A presença de crescimento bacteriano é indicada pela coloração rósea, que significa a metabolização bacteriana do sal de rezasurina. A inibição do crescimento bacteriano é indicada pela cor azul escuro.

A CIM verificada para o *S. mutans* foi de 125 µg/mL, ou seja, esta foi menor concentração capaz de inibir visivelmente o crescimento bacteriano (Figura 9).

Figura 9. Microplaca de cultura ilustrando a CIM (125 µg/mL) da solução de EGCG sobre o *S. mutans* (colunas da esquerda). As colunas da direita ilustram o controle positivo, controle de esterilidade do meio, da água e a concentração inicial de EGCG (4000 µg/mL). A coloração rósea indica presença de crescimento bacteriano e a coloração azul indica ausência de crescimento bacteriano.

A CIM verificada para o *S. sobrinus* e para o *L. casei* foi de 750 $\mu\text{g/mL}$, ou seja, esta foi menor concentração capaz de inibir visivelmente o crescimento bacteriano (Figuras 10 e 11).

CIM – *S. sobrinus*

Figura 10. Microplaca de cultura ilustrando a CIM (750 $\mu\text{g/mL}$) da solução de EGCG sobre o *S. sobrinus* (colunas da esquerda). As colunas da direita ilustram o controle positivo, controle de esterilidade do meio, da água e da concentração inicial de EGCG (4000 $\mu\text{g/mL}$). A coloração rósea indica presença de crescimento bacteriano e a coloração azul indica ausência de crescimento bacteriano.

CIM – *L. casei*

Figura 11. Microplaca de cultura ilustrando a CIM (750 µg/mL) da solução de EGCG sobre o *L. casei* (colunas da esquerda). As colunas da direita ilustram o controle positivo, controle de esterilidade do meio, da água e da concentração inicial de EGCG (4000 µg/mL). A coloração rósea indica presença de crescimento bacteriano e a coloração azul indica ausência de crescimento bacteriano.

4.1.3 Determinação da concentração bactericida mínima (CBM)

Os ensaios de CBM *in vitro* mostraram que a formulação de EGCG apresentou ação bactericida sobre todos os microrganismos cariogênicos avaliados (*S. mutans*, *S. sobrinus* e *L. casei*).

A CBM verificada para o *S. mutans* foi de 250 µg/mL (Figura 12).

CBM - *S. mutans*

Figura 12. Placa de Petri ilustrando a CBM da solução de EGCG sobre o *S. mutans* (seta: 250 µg/mL)

A CBM verificada para o *S. sobrinus* e para o *L. casei* foi de 1000 µg/mL (Figuras 13 e 14).

CBM – *S. sobrinus*

Figura 13. Placa de cultura de *S. sobrinus* para a determinação da CBM. Valor da CBM igual a 1000 µg/mL.

BM – *L. casei*

Figura 14. Placa de cultura de *L. casei* para a determinação da CBM. Valor da CBM igual a 1000 µg/mL.

4.1.4 Síntese dos resultados de CIM e CBM

Os resultados de CIM e CBM estão sintetizados na Tabela 6.

Tabela 6. Microrganismos estudados com os valores obtidos de CIM e CBM.

Bactérias	CIM (µg/mL)	CBM (µg/mL)
<i>S. mutans</i>	125	250
<i>S. sobrinus</i>	750	1000
<i>L. casei</i>	750	1000

4.2 ATIVIDADE ANTIMICROBIANA *IN VIVO*

O estudo *in vivo* da eficácia da formulação de EGCG iniciou-se com a realização de bochechos na concentração de 1000 µg/mL, correspondente à CBM encontrada no estudo *in vitro*, efetiva para todas as cepas bacterianas avaliadas. À seguir a concentração foi sendo gradativamente dobrada até que atingisse um percentual de redução microbiana próximo ao controle positivo (clorexidina 0,12 %, Periogard®), que foi obtido na concentração de 4000 µg/mL. A avaliação *in vivo* foi realizada em 2 crianças para cada concentração testada de EGCG (1000, 2000 e 4000 µg/mL), em 2 crianças para a clorexidina e 2 crianças para a água destilada.

Os resultados foram expressos em percentual de redução microbiana e estão apresentados na Tabela 7 e Figura 15. O percentual médio de redução microbiana da formulação de EGCG na concentração de 4000 µg/mL (86,48%) foi semelhante ao da clorexidina (89,89%) e superior às demais soluções testadas. A água apresentou redução inferior à ambas soluções (52,30%).

Tabela 7. Concentração e percentual de redução microbiana referente ao bochecho com as soluções de EGCG, CHX ou água destilada.

Solução	Pacientes	Concentração	Percentual de redução microbiana (%)	Média (± Desvio Padrão)
EGCG	1	1000 µg/mL	79,56	76,06 (± 4,95)
	2		72,55	
	3	2000 µg/mL	77,83	80,42 (± 3,65)
	4		83,0	
	5	4000 µg/mL	87,0	86,48 (± 0,73)
	6		85,96	
CHX	7	0,12%	81,58	89,90 (± 11,76)
	8		98,21	
Água	9	---	45,33	52,30 (±9,85)
Destilada	10		59,26

Figura 15. Percentual de redução microbiana *in vivo* de *S. mutans*, *S. sobrinus* e lactobacilos após a realização de bochechos com EGCG nas concentrações de 1000 2000 e 4000 µg/mL, clorexidina ou água destilada. * Diferença estatística significativa ($p < 0,05$).

A redução observada durante a contagem de UFC/mL de saliva de crianças que fizeram o uso do bochecho com EGCG e o aspecto morfológico das colônias de estreptococos do grupo mutans estão ilustrados nas Figuras 16 e 17, respectivamente.

Figura 16. Placas de Petri ilustrando a redução no crescimento de microrganismos (*S. mutans* e *S. sobrinus*) antes e após a realização do bochecho com a solução de EGCG.

Figura 17. Fotografia ilustrativa do aspecto morfológico característico das colônias dos estreptococos do grupo mutans presentes na saliva em placa de Petri, visualizado durante a contagem de UFC/mL. A seta em amarelo indica *S. mutans* e a seta em vermelho indica *S. sobrinus*.

Assim, neste estudo piloto, foi observado que as crianças que fizeram o bochecho com a solução de EGCG na concentração de 4000 µg/mL tiveram um percentual de redução semelhante ao encontrado àquelas crianças que realizaram o bochecho com a solução de clorexidina.

4.3 ALTERAÇÃO DE COR DENTAL *IN VITRO*

Em dentes decíduos, a aplicação de água destilada não resultou em diferença estatística significativa nos valores absolutos da coordenada L* após a realização de 1, 5, 10 ou 30 simulações de bochechos ($p > 0,05$), quando comparados com o valor absoluto inicial. Nos valores absolutos das coordenadas a* e b*, verificou-se diferença estatística significativa apenas após a realização de 5, 10 e 30 simulações de bochecho (Figura 18).

Em dentes decíduos, a aplicação da solução de clorexidina não resultou em diferença estatística significativa nos valores absolutos da coordenada L* após a realização de 1, 5 ou 10 bochechos ($p > 0,05$), quando comparados com o valor absoluto inicial. Após a simulação de 30 bochechos, verificou-se diferença estatística significativa. Para as coordenadas a* e b* verificou-se diferença estatística significativa em relação a cor inicial, apenas após a realização de 5, 10 e 30 simulações de bochechos (Figura 19).

Em dentes decíduos, a aplicação da formulação de EGCG não resultou em diferença estatística significativa nos valores absolutos da coordenada L* após a realização de 1, 5 ou 10 bochechos ($p > 0,05$), quando comparados com o valor absoluto inicial. Após a simulação de 30 bochechos, verificou-se diferença estatística significativa. Para as coordenadas a* e b* verificou-se diferença estatística significativa em relação a cor inicial após a realização de 1, 5, 10 e 30 simulações de bochechos (Figura 20).

Em dentes permanentes, a aplicação de água destilada não resultou em diferença estatística significativa nos valores absolutos das coordenadas L*, a* e b* após a realização de 1, 5, 10 ou 30 simulações de bochechos ($p > 0,05$), quando comparados com o valor absoluto inicial (Figura 21).

Em dentes permanentes, a aplicação das soluções de clorexidina e EGCG apresentaram resultados semelhantes ($p < 0,05$). Após a simulação de 1, 5, 10 e 30 bochechos, ambas as soluções apresentaram diferença estatística significativa nas coordenadas L*, a* e b*, quando comparados com o valor absoluto inicial (Figuras 22 e 23).

Água	Inicial			1 bochecho			5 bochechos			10 bochechos			30 bochechos		
	L*	a*	b*	L*	a*	b*	L*	a*	b*	L*	a*	b*	L*	a*	b*
DD															
Média	91,20	-0,36	31,22	92,46	-0,74	30,88	92,30	-0,94	29,88	92,74	-1,08	29,72	92,60	-1,48	27,80
DP	3,51	2,01	5,68	1,44	1,79	5,32	0,88	1,64	5,24	1,12	1,49	5,02	1,38	1,38	4,33

Figura 18. Média e desvio padrão (DP) dos valores absolutos das coordenadas L*, a* e b* dos dentes decíduos após 0, 1, 5, 10 e 30 simulações de bochechos com água destilada, com duração de 1 minuto cada. Diferença estatística não significante: NS. Diferença estatística significante: * ($p < 0,01$), ** ($p < 0,001$) e *** ($p < 0,0001$).

Figura 19. Média e desvio padrão (DP) dos valores absolutos das coordenadas L*, a* e b* dos dentes decíduos após 0, 1, 5, 10 e 30 simulações de bochechos com clorexidina, com duração de 1 minuto cada. Diferença estatística não significativa: NS. Diferença estatística significativa: * ($p < 0,01$), ** ($p < 0,001$) e *** ($p < 0,0001$).

EGCG	Inicial			1 bochecho			5 bochechos			10 bochechos			30 bochechos		
	L*	a*	b*	L*	a*	b*	L*	a*	b*	L*	a*	b*	L*	a*	b*
Média	91,32	-2,89	22,36	89,11	-0,14	29,80	88,59	0,14	29,85	88,25	-4,43	29,30	87,38	0,39	31,00
DP	3,87	0,84	3,41	5,72	1,41	2,72	5,96	1,81	3,77	4,50	2,00	4,44	4,93	2,02	3,95

Figura 20. Média e desvio padrão (DP) dos valores absolutos das coordenadas L*, a* e b* dos dentes decíduos após 0, 1, 5, 10 e 30 simulações de bochechos com EGCG, com duração de 1 minuto cada. Diferença estatística não significativa: NS. Diferença estatística significativa: * (p < 0,01) e *** (p < 0,0001).

Água	Inicial			1 bochecho			5 bochechos			10 bochechos			30 bochechos		
DP	L*	a*	b*	L*	a*	b*	L*	a*	b*	L*	a*	b*	L*	a*	b*
Média	90,66	-0,30	38,68	89,74	-1,44	27,82	90,62	-1,00	29,46	91,06	-0,74	31,14	89,92	0,02	33,32
DP	8,51	3,35	10,96	8,20	1,75	6,96	7,67	2,17	7,05	8,36	2,07	7,47	8,71	2,21	6,66

Figura 21. Média e desvio padrão (DP) dos valores absolutos das coordenadas L*, a* e b* dos dentes permanentes após 0, 1, 5, 10 e 30 simulações de bochechos com água destilada, com duração de 1 minuto cada. Diferença estatística não significativa: NS.

Figura 22. Média e desvio padrão (DP) dos valores absolutos das coordenadas L*, a* e b* dos dentes permanentes após 0, 1, 5, 10 e 30 simulações de bochechos com clorexidina, com duração de 1 minuto cada. Diferença estatística significativa: * ($p < 0,01$) e *** ($p < 0,0001$).

DP	Inicial			1 bochecho			5 bochechos			10 bochechos			30 bochechos		
EGCG	L*	a*	b*	L*	a*	b*	L*	a*	b*	L*	a*	b*	L*	a*	b*
Média	82,48	-2,12	22,20	90,84	1,47	33,84	90,75	1,74	34,70	91,22	1,78	35,83	89,84	2,64	36,90
DP	6,54	1,61	5,58	5,99	2,94	6,47	5,29	3,08	6,85	5,26	3,14	6,96	5,12	3,28	6,55

Figura 23. Média e desvio padrão (DP) dos valores absolutos das coordenadas L*, a* e b* dos dentes permanentes após 0, 1, 5, 10 e 30 simulações de bochechos com EGCG, com duração de 1 minuto cada. Diferença estatística significativa: *** (p< 0,0001).

4.3.1 ANÁLISE DA REVERSIBILIDADE DE ALTERAÇÃO NA COR DOS DENTES

Na análise da reversibilidade na alteração de cor dental causada após a aplicação da nova formulação de EGCG, verificou-se que, após a simulação de 30 bochechos houve alteração de cor dental em todas coordenadas avaliadas (L^* , a^* e b^*). No entanto, após a realização de profilaxia dental com escovas de Robson e pasta profilática os valores absolutos das coordenadas L^* e b^* retornaram à cor inicial (Figura 23).

Figura 24. Média e desvio padrão (DP) dos valores absolutos das coordenadas L^* , a^* e b^* , iniciais (0), após a simulação de 30 bochechos (30) e após a realização de profilaxia dental (P). Diferença estatística não significativa: NS. Diferença estatística significativa: * ($p < 0,01$), ** ($p < 0,001$) e *** ($p < 0,0001$).

Discussão

5 DISCUSSÃO

Atualmente o agente antimicrobiano de uso bucal mais utilizado e considerado padrão ouro na literatura é o digluconato de clorexidina, que apresenta elevado espectro de ação antimicrobiana e efeito residual (Lang et al., 1986; Gjermo et al., 1970; Jones, 1997; Mathur et al., 2011; García-Caballero et al., 2013; Neturi et al., 2014; Mouchrek et al., 2015). No entanto, com o uso prolongado este agente apresenta efeitos colaterais indesejáveis para adultos e, principalmente para crianças, incluindo a descamação de mucosas, alteração de paladar e alteração na cor de dentes e restaurações (Löue et al., 1976; Jones, 1997; Quirynen et al., 2005; Mathur et al., 2011; Supranoto et al., 2015). Até o momento não existe um agente antimicrobiano ideal, com efetiva ação antimicrobiana, efeito residual e ausência de efeitos colaterais. Por este motivo, o objetivo do presente estudo foi desenvolver uma formulação à base de um extrato de planta para uso tópico bucal, que apresentasse atividade antimicrobiana contra microrganismos cariogênicos e pudesse ser utilizado com segurança em crianças portadoras de alto risco e alta atividade da doença cárie.

Em todo o mundo, uma grande diversidade de plantas medicinais vêm sendo popularmente utilizadas para o tratamento de diferentes doenças. No entanto, o potencial terapêutico de muitos extratos naturais ainda é limitado, sendo necessária a realização de investigações científicas que confirmem suas propriedades benéficas para a saúde, incluindo a ação antimicrobiana. A *Camellia sinensis* é a planta que dá origem aos chás branco, verde, preto e *Oolong*. Devido ao seu processo de produção, o chá verde apresenta mais catequinas do que os outros tipos de chás. Dentre as catequinas presentes no chá verde, a mais ativa biologicamente é a Epigallocatequina-3-galato (EGCG), que foi recentemente isolada e purificada, e apresenta comprovada ação antimicrobiana, antioxidante, anti-inflamatória, anti-hipertensiva, antitumoral, mineralizadora e regeneradora em diferentes condições patológicas (Ikigai et al., 1993; Yang et al., 1998; Anghileri e Thouvenot, 2000; Stapleton e Taylor, 2002; Nakanishi et al., 2010; Wen et al., 2013; Aslan et al., 2014; Sinha et al., 2014; Yousaf et al., 2014; Butt et al., 2015). Por esse motivo esta catequina derivada do chá verde foi selecionada no presente estudo para o desenvolvimento da formulação tópica de uso bucal, sendo selecionada a EGCG produzida pela Sigma, que apresenta elevado teor de pureza e solubilidade em água. Ainda, em estudo anterior realizado por nosso grupo de pesquisa, foi comprovada sua estabilidade físico-química bem como a compatibilidade tecidual (Ferreira, 2015).

A avaliação da atividade antimicrobiana de extratos vegetais pode ser determinada *in vitro* por meio de testes de sensibilidade que podem ser realizados para qualquer

microrganismo envolvido em doenças infecciosas que justifiquem a necessidade da terapêutica antimicrobiana (NCCLS, 2003). No presente trabalho a atividade antimicrobiana da formulação de EGCG foi inicialmente determinada em estudo *in vitro*, frente à microrganismos envolvidos na doença cárie: *S. mutans*, *S. sobrinus* e *L. casei*. A seleção destas espécies fundamentou-se no fato de serem os principais agentes etiológicos da cárie dental, devido aos seus vários fatores de virulência, como acidogênese e aciduricidade, alta capacidade de adaptação ao ambiente, presença de adesinas na superfície celular e produção de polissacarídeos extracelulares (Mattos-Granner, 1999). Estes microrganismos também vêm sendo utilizados em diversos estudos que avaliam a ação antimicrobiana de diferentes substâncias de uso bucal (De Rossi et al., 2005; Esteves et al., 2010; Neturi et al., 2014; Sharma et al., 2014; Tarasingh et al., 2015).

Diversos métodos laboratoriais podem ser utilizados para avaliar a sensibilidade *in vitro* de bactérias à novos agentes antimicrobianos, como a diluição em caldo, realizada por meio de macrodiluição e microdiluição, ou diluição em ágar (Saraiva, 2012). No presente estudo foi selecionado o método de diluição em caldo, realizado por meio da microdiluição, como desenvolvido por Eloff em 1998, que possibilita a determinação da menor concentração da substância testada necessária para inibir o crescimento do microrganismo-teste, denominada concentração inibitória mínima (CIM). As vantagens da aplicação dessa metodologia incluem o baixo custo operacional, elevada reprodutibilidade, sendo 30 vezes mais sensível que outros métodos utilizados na literatura, necessidade de pequena quantidade de amostra, possibilidade de avaliação de um grande número de amostras, obtenção de um registro permanente (Eloff, 1998), além da simplicidade de execução e rapidez, uma vez que várias concentrações do produto podem testadas em um único ensaio (Libanore, 2008; Gabrielson et al., 2002). Esta metodologia também vem sendo muito utilizada na literatura principalmente devido à sua sensibilidade e necessidade de utilização de quantidade mínima de reagente, o que possibilita a obtenção um maior número de réplicas, aumentando a confiabilidade dos resultados (da Silva et al., 2013; Rey et al., 2014; Inglin et al., 2015). Embora essa técnica possa apresentar algumas limitações, tais como a adesão de alguns microrganismos à base do poço (Eloff, 1998), precipitação de compostos presentes em alguns extratos e aparecimento de coloração verde da clorofila em concentração muito alta, que pode interferir na análise (Ostrosky et al., 2008), essas limitações não foram observadas no presente estudo.

Para a realização de estudos antimicrobianos *in vitro*, a seleção do meio de cultura é uma etapa muito importante. O meio de cultura consiste na associação de substâncias que forneçam nutrientes necessários ao desenvolvimento (cultivo) de microrganismos fora do seu

meio natural. O meio de cultura utilizado no presente trabalho foi o caldo BHI (*Brain Heart Infusion*), que foi escolhido por permitir um crescimento adequado aos microrganismos cariogênicos avaliados (Khoo et al., 2005; Esteves et al., 2010; Lee, 2013; Sharma et al., 2014; Soares et al., 2015). O BHI é composto por nutrientes de cérebro e coração de gado, peptona e dextrose. A peptona e a infusão de cérebro e coração de gado são fontes de nitrogênio, carbono, enxofre e vitaminas e a dextrose é um carboidrato que os microrganismos utilizam para fermentação. Este meio também é utilizado para cultivo de estreptococos, pneumococos, meningococos, enterobactérias, não fermentadores, leveduras e fungos. Pode ser utilizado na preparação do inóculo para teste de susceptibilidade aos antimicrobianos, para realização de teste de coagulase em tubo, para teste de crescimento bacteriano e para teste de motilidade em lâmina. Sua cor original é amarelo claro e límpido, assim, a presença de turvação significa que houve crescimento bacteriano (ANVISA, 2004). No presente estudo, o meio BHI foi eficaz e ofereceu condições favoráveis para o crescimento e identificação dos microrganismos cariogênicos avaliados.

Além da seleção do meio de cultura, outra etapa importante no estudo *in vitro* é a seleção do revelador de crescimento bacteriano. No presente estudo foi utilizado o revelador resazurina (Resazurin sodium salt powder), um indicador de oxidação-redução, que tem sido utilizado por muito autores para avaliar a viabilidade celular e a contaminação bacteriana (Carter et al., 1998; Mann e Markham, 1998; Smith e Townsend, 1999; Fukushima et al., 2003; Saraiva, 2012). A mudança de cor de azul para rosa indica redução de resazurina e portanto presença de crescimento bacteriano, sendo assim determinada a CIM, ou seja, a menor concentração da droga que impede esta mudança de cor. Os métodos colorimétricos que utilizam a resazurina como revelador são denominados REMA (Resazurin microtiter assay) e seus resultados podem ser facilmente interpretados, sendo ainda uma técnica rápida, simples e de baixo custo (Palomino et al., 2002), além de ter a vantagem de não requer absorção pela célula bacteriana (Mann e Markham, 1998). Existem relatos que, por ser testado em meio líquido, podem surgir problemas de contaminação (Palomino et al., 2002). Assim, no presente estudo também foi realizado um controle de esterilidade, que possibilitou definir com segurança a CIM da EGCG sobre *S. mutans* (125 µg/mL), *S. sobrinus* (750 µg/mL) e *L. casei* (750 µg/mL). Estudos futuros podem ser realizados para dar continuidade à avaliação da atividade antimicrobiana *in vitro* da EGCG, incluindo a determinação da CIM e CBM frente à outros microrganismos, como periodontopatogênicos e endodontopatogênicos.

Após a determinação da CIM e CBM da EGCG *in vitro*, frente aos microrganismos cariogênicos, buscamos avaliar se esta ação antimicrobiana era mantida *in vivo* no ambiente

bucal, na presença de componentes salivares e dentais, bem como definir a concentração antimicrobiana de uso clínico que mais se aproximasse da clorexidina. Para esta finalidade, neste trabalho realizamos um estudo piloto visando avaliar o efeito de diferentes concentrações de EGCG na contagem de *S. mutans*, *S. sobrinus* e *L. casei* em amostras de saliva da cavidade bucal de crianças portadoras de alto risco e alta atividade da doença cárie, que apresentam portanto indicação para a realização de terapia antimicrobiana. A seleção de crianças nestas condições obedeceu critérios anamnésicos e clínicos, avaliados por meio do preenchimento de ficha específica, além de critérios microbiológicos, sendo incluídas no estudo apenas crianças que apresentavam elevada contagem salivar de estreptococos do grupo mutans (acima de 10^6 UFC/mL de saliva).

Para determinar a eficácia e definir a concentração ideal de uso clínico da formulação de EGCG foi realizada comparação com um grupo controle positivo, a clorexidina, e um controle negativo, a água. Embora o presente estudo tenha utilizado um número pequeno de crianças no estudo clínico, tanto no grupo experimental como no controle, este foi apenas um piloto e estudos clínicos futuros serão realizados com um número maior de crianças e também para avaliar seu possível efeito residual, por meio de coletas salivares realizadas algum tempo após a realização de um ou mais bochechos.

No presente estudo realizamos a análise de redução de microrganismos cariogênicos presentes na saliva. Amostras de saliva vêm sendo muito utilizadas para esta finalidade por diferentes autores (De Rossi et al., 2005; Cousido et al., 2008; Ferrazzano et al., 2011; Sánchez-Pérez et al., 2015). No entanto, esta análise também poderia ser realizada em amostras de biofilme dental (Guggenheim e Meier, 2011; Neturi et al., 2014; Soares et al., 2015). Ainda, a coleta de saliva pode ser realizada em amostras obtidas de forma estimulada, por parafina ou gomas de mascar, ou sem qualquer tipo de estimulação, como no presente estudo e estudos anteriores que comprovam ser este o tipo de saliva mais indicado para esta análise (De Rossi et al., 2005; Cousido et al., 2008; Tulsani et al., 2014). Ainda, quantificação de lactobacilos e de estreptococos do grupo mutans na saliva é a técnica mais indicada para avaliação do risco de cárie dental (Mayer, 1991).

A coexistência de *S. mutans* e *S. sobrinus* é um importante fator no desenvolvimento da cárie dental (Lindquist e Emilson, 1991), uma vez que quando ambas as espécies estão presentes na cavidade bucal evidencia-se maior experiência de cárie nos indivíduos que quando se detecta apenas *S. mutans* (Kohler e Bjarnason, 1987; Seki et al., 2006). No presente estudo foi possível a identificação e diferenciação de ambas espécies do grupo mutans, o que comprova microbiologicamente a seleção de crianças com alta atividade de cárie elevada, selecionadas com base em parâmetros clínicos e anamnésicos.

Quando se emprega técnicas de cultura microbiana para quantificação de microrganismos, seja em amostras de saliva ou de biofilme dental, a porcentagem de recuperação de *S. mutans* e de *S. sobrinus* depende, em parte, do meio de cultura empregado (Emilson e Bratthall, 1976; Dasanayake et al., 1995; Hildebrandt e Bretz, 2006). A utilização de meios de cultura seletivos, de fácil preparação, é de fundamental relevância na área da Cariologia, principalmente para o estudo de populações com elevado risco à cárie. O meio de cultura SB-20 foi proposto por Davey e Rogers (Davey e Rogers, 1984). É um meio de cultura formulado com a adição de altas concentrações de sacarose, a fim de facilitar o crescimento dos estreptococos do grupo mutans, e de altas concentrações de bacitracina, para inibir o crescimento de outros estreptococos da cavidade bucal (Hildebrandt e Bretz, 2006). A seguir, Ito et al. (1993) e Azevedo e Zelante (1994) publicaram estudos propondo a substituição da sacarose por açúcar cristal no meio SB-20, reduzindo o custo da preparação desse meio de cultura, que foi chamado de Ágar SB-20 modificado. Sabe-se que o meio SB-20 modificado é seletivo para estreptococos do grupo mutans e por ser incolor, facilita a diferenciação e a contagem de *S. mutans* e *S. sobrinus* (Azevedo e Zelante, 1994; Sato et al., 2005; Nelson-Filho et al., 2006; Saravia et al., 2011). O meio de cultura SB-20 modificado foi o meio utilizado no presente estudo e também vem empregado em diversos estudos, incluindo os realizados por nosso grupo de pesquisa (Azevedo, 1988; Torres et al., 1993; Azevedo e Zelante, 1994; Nelson-Filho et al., 1996; Azevedo et al., 1998; Pimenta et al., 2001; De Rossi et al., 2005; Nelson-Filho et al., 2006; Aysegul et al., 2007; Peixoto et al., 2009; Saravia et al., 2011; 2013).

O meio Ágar Rogosa SL é um meio seletivo sólido para cultivo de lactobacilos orais e fecais (Rogosa et al., 1951). Para a determinação dos níveis salivares de lactobacilos, este é o meio mais indicado, cuja capacidade seletiva é dada pelo baixo pH (5,4) e pela presença de azida sódica, que impede o desenvolvimento de bacilos Gram-negativos e de fungos. Este meio de cultura também foi selecionado na presente pesquisa por ser o mais indicado e empregado por muitos autores (Kote et al., 2011; Guglielmi et al., 2011; Volokhov et al., 2012; Gudipaneni et al., 2014; Bai e Vaz, 2015).

Os resultados do estudo *in vivo* mostraram que a formulação de EGCG também apresentou atividade antimicrobiana contra microrganismos cariogênicos, sendo a concentração de 4000 µg/mL (86,48% de redução microbiana) a que mais se aproximou da ação antimicrobiana da clorexidina (89,89% de redução microbiana). Embora, até o presente momento, não existam estudos que permitam a comparação dos resultados de redução microbiana causados após a utilização da EGCG, acreditamos que esses foram promissores e positivos. Alguns estudos similares realizados com o chá verde também mostraram

resultados antimicrobianos muito próximos ao da clorexidina, embora tenham sido inferiores aos obtidos no presente estudo e realizados em adultos (Ferrazzano et al., 2011; Neturi et al., 2014). Em um desses estudos, realizados *in vivo* por Ferrazzano et al. (2011), o bochecho com chá verde resultou em baixos níveis de estreptococos do grupo mutans em 60% dos indivíduos adultos avaliados enquanto 42,4% dos indivíduos apresentaram baixos níveis de lactobacilos quando comparados com os indivíduos que usaram o bochecho placebo. Esta ação eficaz, tanto da EGCG como do chá verde, pode ser explicada pelas propriedades antibacterianas dos polifenóis associados com a inibição da aderência das células bacterianas nas superfícies dentais (Otake et al., 1991). Embora o custo da formulação de chá verde ainda seja bem inferior ao da formulação de EGCG, estudos adicionais devem ser realizados para reduzir custos uma vez que a EGCG não apresenta toxicidade tecidual e apresenta atividade antimicrobiana que mais se aproxima da clorexidina.

Atualmente, o aumento das exigências estéticas dos pacientes torna importante a avaliação de possíveis mudanças de cor do dente em decorrência de novos tratamentos odontológicos (Moreira et al., 2012). Uma vez que a EGCG é derivada do chá verde, uma bebida com potencial de causar alteração de cor dental (Attin et al., 2003), o presente estudo também avaliou o possível efeito da sua aplicação tópica na coroa dental de dentes decíduos e permanentes. A alteração de cor foi avaliada após a simulação de realização de 1, 5, 10 e 30 bochechos, visando determinar o possível manchamento dental após o uso por tempo prolongado.

O espectrofotômetro vem sendo utilizado por vários autores para avaliar alteração de cor dental em materiais restauradores (Attin et al., 2003; Pires-de-Souza et al., 2011; Moreira et al., 2012; Sabatini et al., 2012) e foi a metodologia escolhida no presente estudo uma vez que sua análise quantitativa exclui os possíveis erros de subjetividade na avaliação de cor (Paul et al., 2002; Moreira et al., 2012). Sabe-se que percepção de cor por meio de avaliação visual é subjetiva e varia de pessoa para pessoa. Essa subjetividade é resultado de muitos fatores, como a posição do objeto observado e do observador com relação à iluminação; a cor da luz utilizada para a iluminação; metamerismo, fadiga e envelhecimento do objeto; bem como a fisiologia e o estado emocional do observador (Yannikakis, et al., 1998). A avaliação de cor foi realizada pelo sistema CIELab, com análise dos valores absolutos de L^* , a^* e b^* . No entanto alguns estudos utilizam uma fórmula para a avaliação do ΔE ($\Delta E = [(\Delta L^*)^2 + (\Delta a^*)^2 + (\Delta b^*)^2]^{1/2}$). Onde: ΔE^* = alteração de cor, ΔL^* = diferença do eixo L^* , Δa^* = diferença do eixo a^* , Δb^* = diferença do eixo b^*). Esta fórmula é aplicada para avaliar alteração de cor em materiais odontológicos (Pires-de-Souza et al., 2011;

Moreira et al., 2012; Sabatini et al., 2012). Esse valor é aceitável clinicamente quando inferior a 3.3 (Sabatini et al., 2012; Pires-de-Souza et al., 2011). No entanto existem controvérsias pois alguns autores consideram como inaceitável valores de ΔE maior ou igual a 2 (O'Brien et al., 1990) ou maior ou igual a 3.7 (Kim e Lee, 2009).

No presente estudo também realizamos o cálculo do ΔE , porém estes não foram confiáveis pois todos os grupos foram superiores a 3.3, inclusive a água, o que seria clinicamente inaceitável. Falhas metodológicas decorrentes da aplicação dessa fórmula também foram relatadas em estudo recente sobre confiabilidade metodológica do sistema CIELAB, que revelou que as coordenadas a^* e b^* podem ser correlacionadas, pois estão localizadas no mesmo plano volumétrico tridimensional, enquanto a coordenada L^* , sofre variação independente de a^* e b^* (Knosel et al., 2012). Por esse motivo optamos pela apresentação das conclusões tendo como base os valores absolutos e independentes das coordenadas L^* , a^* e b^* , de acordo com o CIELAB. A avaliação da alteração de cor das coordenadas L^* , a^* e b^* , independentes, também vêm sendo realizada com confiança por outros autores (Ferreira, 2013; Shi et al., 2013;).

A utilização de EGCG como enxaguatório na superfície dos dentes causou alteração da cor dental semelhante à utilização de clorexidina. Ainda, a alteração de cor foi mais rápida em dentes permanentes, sendo observado alteração no valor absoluto L^* à partir da realização de um bochecho, já em dentes decíduos o valor absoluto L^* se mostrou alterado à partir da realização de 30 bochechos. A utilização da formulação de EGCG e clorexidina resultaram em alteração de cor dental de forma semelhante nos valores absolutos de L^* , a^* e b^* , sendo esta alteração reversível para L^* e b^* , onde os valores retornaram aos iniciais após a realização de profilaxia dental; fato já conhecido após o uso da clorexidina. Este estudo foi realizado apenas em dentes decíduos pois já se sabe que os efeitos da clorexidina devido ao fato de ambos os dentes, decíduos e permanentes, terem apresentado alteração de cor de forma semelhante.

Embora não existam na literatura estudos relatando alteração de cor dental causada pelo uso da EGCG, a alteração de cor dental causada pela clorexidina já é conhecida como efeito colateral reversível (Supranoto et al., 2015). Sabe-se que a clorexidina provoca alteração da cor dos dentes e também de restaurações (Jenkins et al., 1993; Rovai et al., 2013; Supranoto et al., 2015). McCoy et al. (2008) relatou alteração na coloração dos dentes e restaurações em 18% dos pacientes em uso de clorexidina (0,12%) durante o período de 14 dias. Em 2006, Guimarães et al. (2006) mostrou que 55% dos pacientes que utilizaram enxaguatório de clorexidina 0,12% apresentaram manchas dentais. No presente estudo utilizamos apenas dentes decíduos hígidos para a avaliação de cor, assim estudos futuros

são necessários para avaliar o possível efeito da EGCG sobre dentes portadores de lesões de cárie ou de restaurações dentais.

Diante dos resultados laboratoriais e clínicos, o presente estudo mostrou resultados promissores para a possível utilização da EGCG como solução antimicrobiana colutória para crianças. No entanto, estudos futuros são necessários para aprimorar as propriedades da formulação, principalmente relacionadas à alteração de cor dental, além de avaliar a possível associação com corantes, conservantes ou flavorizantes, favorecendo seu aspecto visual e oferecendo sabor agradável. Ainda, os recentes avanços trazidos pela nanotecnologia, que se refere à tecnologia utilizada para manipular estruturas pequenas e torná-las mais reativas, podem proporcionar o desenvolvimento de fármacos mais eficazes em menores concentrações, o que poderia reduzir custos, aumentar ação e eliminar o efeito colateral de alteração de cor (Adrian et al., 2011, Kwong et al., 2011; Yoncheva e Momekov, 2011). Assim, também sugere-se o futuro desenvolvimento de outras formulações de EGCG utilizando os benefícios da nanotecnologia, que ajudaria na potencialização de seu efeito.

Conclusão

6 CONCLUSÃO

Com base nas metodologias e nos resultados obtidos no presente estudo pode-se concluir que a formulação à base de EGCG desenvolvida apresentou efeito antimicrobiano contra microrganismos cariogênicos (*S. mutans*, *S. sobrinus* e *L. casei*), *in vitro* e *in vivo*, e causou alteração de cor dental reversível.

Referências

REFERÊNCIAS

- Adrian JE, Wolf A, Steinbach A, Rössler J, Süss R. Targeted Delivery to Neuroblastoma of Novel siRNA-anti-GD2-liposomes Prepared by Dual Asymmetric Centrifugation and Sterol-Based Post-Insertion Method. *Pharm Res.* 2011;28(9):2261-72.
- Albert-Kiszely A, Pjetursson BE, Salvi GE, Witt J, Hamilton A, Persson GR, Lang NP. Comparison of the effects of cetylpyridinium chloride with an essential oil mouth rinse on dental plaque and gingivitis - a six-month randomized controlled clinical trial. *J Clin Periodontol.* 2007;34(8):658-67.
- Aldana J, Téllez N, Gamboa F. Antimicrobial activity of fractions and subfractions of *Elaeagia utilis* against microorganisms of importance in dental caries. *Acta Odontol Latinoam.* 2013;26(2):104-11.
- Allaker, R.P. and Douglas, C.W. Novel anti-microbial therapies for dental plaque-related diseases. *Int J Antimicrob Agents* 2009;33:8-13.
- Allen TM, Austin GA, Chonn A, Lin L, Lee KC. Uptake of liposomes by cultured mouse bone marrow macrophages: influence of liposome composition and size. *Biochim Biophys Acta.* 1991; 1061(1):56-64.
- Andolfatto C, da Silva GF, Cornélio AL, Guerreiro-Tanomaru JM, Tanomaru-Filho M, Faria G, Bonetti-Filho I, Cerri PS. Biocompatibility of intracanal medications based on calcium hydroxide. *ISRN Dent.* 2012.
- Anghileri LJ, Thouvenot P. Natural polyphenols-iron interaction: its biological importance. *Biol Trace Elem Res.* 2000;73(3):251-8.
- Anita P, Sivasamy S, Madan Kumar PD, Balan IN, Ethiraj S. In vitro antibacterial activity of *Camellia sinensis* extract against cariogenic microorganisms. *J Basic Clin Pharm.* 2014;6(1):35-9.
- ANVISA. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Descrição dos Meios de Cultura Empregados nos Exames Microbiológicos. 2004. Pgs 15 e 16.
- Arweiler, N.B., Auschill, T.M., Reich, E. and Netuschil, L. Substantivity of toothpaste slurries and their effect on reestablishment of the dental biofilm. *J Clin Periodontol* 2002;29:615-21
- Asahi Y, Noiri Y, Miura J, Maezono H, Yamaguchi M, Yamamoto R, Azakami H, Hayashi M, Ebisu S. Effects of the tea catechin Epigallocatechin Gallate on *Porphyromonas gingivalis* biofilms. *J Appl Microbiol* 2014;16(5):1164-71.
- Aslan C, Melikoglu C, Ocal I, Saglam G, Sutcu R, Hosnuter M. Effect of epigallocatechin gallate on ischemia-reperfusion injury: an experimental study in a rat epigastric island flap. *Int J Clin Exp Med.* 2014;15:7(1):57-66
- Attin T, Manolakis A, Buchalla W, Hannig C. Influence of tea on intrinsic colour of previously bleached enamel. *J Oral Rehabil.* 2003;30:488-94.
- Aysegul O, Elgin IE, Gulcin A, Nedim S. The efficacy of chlorhexidine spray vs mouthwash in the microbial contamination of child toothbrushes. *J Dent Child.* 2007;74(3):177-81.

Azevedo RV, Zelante F. Streptococci of the mutans group: confirmation of intrafamilial transmission by mutacin typing. *Braz Dent J.* 1994;5(1):27-34.

Azevedo RVP, Freitas AC, Assed S, Silva LAB, Nelson-Filho P, Ito IY. Estreptococos do grupo mutans: Determinação do risco à cárie e da prevalência das espécies na saliva de crianças - Método da espátula. *Revista de Odontopediatria.* 1993;(2):91-6.

Azevedo RVP, Nelson-Filho P, Assed S, Ito IY. Estreptococos do grupo mutans: Isolamento, identificação e prevalência das espécies na saliva de pares mãe/filho. *Rev Odontol Univ Sao Paulo* 1998;12(1):47-50.

Azevedo RVP. O emprego da bacteriotipagem(mutacinotipagem), no rastreamento epidemiológico de estreptococos do grupo "mutans" [Tese de Doutorado]. São Paulo: Instituto de Ciências Biomédicas da USP;1988.

Bai MP, Vaz AC. "Comparative evaluation of surface modified elastomeric ligatures for microbial colonization": An in vivo study. *Indian J Dent Res.* 2015;26(2):180-5.

Bosio K, Avanzini C, D'Avolio A, Ozino O, Savoia D. In vitro activity of propolis against *Streptococcus pyogenes*. *Lett Appl Microbiol.* 2000;31(2):174-7.

Butt MS, Ahmad RS, Sultan MT, Qayyum MM, Naz A. Green tea and anticancer perspectives: updates from last decade. *Crit Rev Food Sci Nutr.* 2015;55(6):792-805.

Carter, R. A., S. A. Ericsson, C. D. Corn, P. R. Weyerts, M. G. Dart, S. G. Escue, and J. Mesta. 1998. Assessing the fertility potential of equine semen samples using the reducible dyes methylene green and resazurin. *Arch. Androl.* 40:59-66.

Charles CA, McGuire JA, Qaqish J, Amini P. Increasing antiplaque/antigingivitis efficacy of an essential oil mouthrinse over time: an in vivo study. *Gen Dent.* 2013;61(1):23-8.

Chen PN, Chu SC, Kuo WH, Chou MY, Lin JK, Hsieh YS. Epigallocatechin-3 gallate inhibits invasion, epithelial-mesenchymal transition, and tumor growth in oral cancer cells. *J Agric Food Chem.* 2011;59(8):3836-44.

Ciancio SG. Improving our patients' oral health: the role of a triclosan/copolymer/ fluoride dentifrice. *Compend Contin Educ Dent.* 2007;28(4):178-80.

Cortelli SC, Costa FO, Rode Sde M, Haas AN, de Andrade AK, Pannuti CM, Escobar EC, de Almeida ER, Cortelli JR, Pedrazzi V. Mouthrinse recommendation for prosthodontic patients. *Braz Oral Res.* 2014;28 Spec.

Costa X, Laguna E, Herrera D, Serrano J, Alonso B, Sanz M. Efficacy of a new mouth rinse formulation based on 0.07% cetylpyridinium chloride in the control of plaque and gingivitis: a 6-month randomized clinical trial. *J Clin Periodontol.* 2013;40(11):1007-15.

Cousido MC, Tomás M, Tomás I, Limeres J, García-Caballero L, Diz P. Effect of a neutralising agent on the evaluation of the antimicrobial activity of chlorhexidine on the bacterial salivary flora. *Arch Oral Biol.* 2008;53(10):981-4.

da Silva BR, de Freitas VA, Carneiro VA, Arruda FV, Lorenzón EN, de Aguiar AS, Cilli EM, Cavada BS, Teixeira EH. Antimicrobial activity of the synthetic peptide Lys-a1 against oral streptococci. *Peptides.* 2013;42:78-83.

Dasanayake AP, Caufield PW, Cutter GR, Roseman JM, Köhler B. Differences in the detection and enumeration of mutans streptococci due to differences in methods. *Arch Oral Biol*. 1995;40(4):345-51.

Davey AL, Rogers AH. Multiple types of the bacterium *Streptococcus mutans* in the human mouth and their intra-family transmission. *Arch Oral Biol* 1984;29:453-60.

Davies R, Scully C, Preston AJ. Dentifrices--an update. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal*. 2010;15(6):e976-82.

Davies RM. The delivery of superior oral health benefits with dentifrices containing triclosan: De Man JC, Rogosa M, Sharpe ME. A medium for the cultivation of *Lactobacilli*, *J Appl Microbiol* 1960;23(1):130-35.

De Rossi M, Rossi A de, Queiroz AM, Azevedo RVP, Ito IY, Nelson Filho P. Adequação do meio bucal e seu efeito sobre a microbiota salivar cariogênica. *Rev Ibero-am Odontopediatr Odontol Bebê* 2005;8(43):210-7.

Du X, Huang X, Huang C, Wang Y, Zhang Y. Epigallocatechin-3-gallate (EGCG) enhances the therapeutic activity of a dental adhesive. *J Dent*. 2012;40(6):485-92.

Durso SC, Vieira LM, Cruz JN, Azevedo CS, Rodrigues PH, Simionato MR. Sucrose Substitutes Affect the Cariogenic Potential of *Streptococcus mutans* Biofilms. *Caries Res*. 2014;48(3):214-222

Dzink JL, Socransky SS. Comparative in vitro activity of sanguinarine against oral microbial isolates. *Antimicrob Agents Chemother*. 1985;27(4):663-5.

Eloff, JN, 1998 - A sensitive and quick microplate method to determine the minimal inhibitory concentration of plant extracts for bacteria. *Planta Med*. 1998;64(8):711-3.

Emilson CG, Bratthall D. Growth of *Streptococcus mutans* on various selective media. *J Clin Microbiol*. 1976;4(1):95-98.

Esteves CM, Ota-Tsuzuki C, Reis AF, Rodrigues JA. Antibacterial activity of various self-etching adhesive systems against oral streptococci. *Oper Dent*. 2010;35(4):448-53.

Fang CY, Wu CC, Hsu HY, Chuang HY, Huang SY, Tsai CH, Chang Y, Tsao GS, Chen CL, Chen JY. EGCG inhibits proliferation, invasiveness and tumor growth by up-regulation of adhesion molecules, suppression of gelatinases activity, and induction of apoptosis in nasopharyngeal carcinoma cells. *Int J Mol Sci*. 2015;16(2):2530-58.

Fejerskov O, Kidd E. *Cárie Dentária a Doença e Seu Tratamento Clínico*. São Paulo: Ed. Santos; 2007;49-69.

Ferrazzano GF, Roberto L, Amato I, Cantile T, Sangianantoni G, Ingenito A. Antimicrobial properties of green tea extract against cariogenic microflora: an in vivo study. *J Med Food*. 2011;14(9):907-11.

Ferreira DCA. Desenvolvimento e caracterização química de um sistema para liberação intracanal de Epigallocatequina-3-galato e seu efeito na cor dos dentes [Dissertação de Mestrado]. Ribeirão Preto: Universidade de São Paulo; 2013.

Ferreira DCA. Formulação à base de epigallocatequina-3-galato, derivada do chá verde, desenvolvida para uso endodôntico: estudo físico-químico e biológico [Tese de Doutorado]. Ribeirão Preto: Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto; 2015.

Frandsen A. Mechanical oral hygiene practices. In: Loe, H. & Kleinman, D.V., eds. Dental Plaque Control Measures and Oral Hygiene Practices. Oxford, Washington DC: IRL Press, 1986;93-116.

Fukushima RS, Weimer PJ, Kunz DA. Use of photocatalytic reduction to hasten preparation of culture media for saccharolytic *Clostridium* species. *Braz J Microbiol*; 2003;1(34):22-26.

Gabrielson J, Hart M, Jarelov A. Evaluation of redox indicators and the use of digital scanners and spectrophotometer for quantification of microbial growth in microplates. *J of Microbiol Meth*. 2002;50:63-73.

García-Caballero L, Quintas V, Prada-López I, Seoane J, Donos N, Tomás I. Chlorhexidine substantivity on salivary flora and plaque-like biofilm: an in situ model. *PLoS One*. 2013;8(12):e83522..

Ghasempour M, Moghadamnia AA, Abedian Z, Amir MP, Feizi F, Gharekhani S. In vitro viability of human periodontal ligament cells in green tea extract. *J Conserv Dent*. 2015;18(1):47-50.

Gjerme P, Baastad KL, Rølla G. The plaque-inhibiting capacity of 11 antibacterial compounds. *J Periodontal Res* 1970;5(2):102-109.

Gudipani RK, Kumar R V, G J, Peddengatagari S, Duddu Y. Short term comparative evaluation of antimicrobial efficacy of tooth paste containing lactoferrin, lysozyme, lactoperoxidase in children with severe early childhood caries: a clinical study. *J Clin Diagn Res*. 2014;8(4):ZC18-20.

Guggenheim B, Meier A. In vitro effect of chlorhexidine mouth rinses on polyspecies biofilms. *Schweiz Monatsschr Zahnmed*. 2011;121(5):432-41.

Guglielmi CD, Simionato MR, Ramalho KM, Imparato JC, Pinheiro SL, Luz MA. Clinical use of photodynamic antimicrobial chemotherapy for the treatment of deep carious lesions. *J Biomed Opt*. 2011;16(8):088003.

Guimaraes AR, Peres MA, Vieira de S, Ferreira RM, Ramos-Jorge ML, Apolinario S. Self-perception of side effects by adolescents in a chlorhexidine-fluoride-based preventive oral health program. *J Appl Oral Sci*. 2006;14(4):291-6.

Haas AN, Pannuti CM, Andrade AK, Escobar EC, Almeida ER, Costa FO, Cortelli JR, Cortelli SC, Rode SD, Pedrazzi V, Oppermann RV. Mouthwashes for the control of supragingival biofilm and gingivitis in orthodontic patients: evidence-based recommendations for clinicians. *Braz Oral Res*. 2014;28(spe):1-8.

Hamada S, Slade HD. Biology, immunology, and cariogenicity of *Streptococcus mutans*. *Microbiol Rev*. 1980;44(2):331-84.

Hamilton-Miller JM. Anti-cariogenic properties of tea (*Camellia sinensis*). *J Med Microbiol*. 2001;50(4):299-302. Review.

- Hara K, Ohara M, Hayashi I, Hino T, Nishimura R, Iwasaki Y, Ogawa T, Ohyama Y, Sugiyama M, Amano H. The green tea polyphenol (-)-epigallocatechin gallate precipitates salivary proteins including alpha-amylase: biochemical implications for oral health. *Eur J Oral Sci.* 2012;120(2):132-9.
- Hildebrandt GH, Bretz WA. Comparison of culture media and chairside assays for enumerating mutans streptococci. *J Appl Microbiol.* 2006 Jun;100(6):1339-47.
- Hirasawa M, Takada K, Otake S. Inhibition of acid production in dental plaque bacteria by green tea catechins. *Caries Res.* 2006;40:265-270.
- Ho YC, Yang SF, Peng CY, Chou MY, Chang YC. Epigallocatechin-3-gallate inhibits the invasion of human oral cancer cells and decreases the productions of matrix metalloproteinases and urokinase-plasminogen activator. *J Oral Pathol Med.* 2007;36(10):588-93.
- Hodgson JM1, Croft KD. Tea flavonoids and cardiovascular health. *Mol Aspects Med.* 2010;31(6):495-502.
- Horiba N, Maekawa Y, Ito M, Matsumoto T, Nakamura H. A pilot study of Japanese green tea as a medicament: antibacterial and bactericidal effects. *J Endod.* 1991;17(3):122-4.
- Hrishi T, Kundapur P, Naha A, Thomas B, Kamath S, Bhat G. Effect of adjunctive use of green tea dentifrice in periodontitis patients - A Randomized Controlled Pilot Study. *Int J Dent Hyg.* 2015.
- Hu J, Du X, Huang C, Fu D, Ouyang X, Wang Y. Antibacterial and physical properties of EGCG-containing glass ionomer cements. *J Dent.* 2013;41(10):927-34.
- Hwang JY, Choi SC, Park JH, Kang SW. The use of green tea extract as a storage medium for the avulsed tooth. *J Endod.* 2011;37(7):962-7.
- Ikigai H, Nakae T, Hara Y, Shimamura T. Bactericidal catechins damage the lipid bilayer. *Biochim Biophys Acta.* 1993;1147(1):132.
- Inglin RC, Stevens MJ, Meile L, Lacroix C, Meile L. High-throughput screening assays for antibacterial and antifungal activities of *Lactobacillus* species. *J Microbiol Methods.* 2015;114:26-9.
- Ito IY, Albuquerque Júnior RF, Alonso Verri R. *Estreptococos: modificação na técnica de identificação das cepas isoladas da cavidade oral 1993*, Anais Ribeirão Preto: USP, 1993. p. 5.
- Jenabian N, Moghadamnia AA, Karami E, Mir A PB. The effect of *Camellia Sinensis* (green tea) mouthwash on plaque-induced gingivitis: a single-blinded randomized controlled clinical trial. *Daru.* 2012;20(1):39.
- Jenkins S, Addy M, Newcombe R. The effects of a chlorhexidine toothpaste on the development of plaque, gingivitis and tooth staining. *J Clin Periodontol.* 1993;20(1):59-62.
- Jeon J, Kim JH, Lee CK, Oh CH, Song HJ. The Antimicrobial Activity of (-)-Epigallocatechin-3-Gallate and Green Tea Extracts against *Pseudomonas aeruginosa* and *Escherichia coli* Isolated from Skin Wounds. *Ann Dermatol.* 2014;26(5):564-9.
- Jolly M, Singh N, Rathore M, Tandon S, Banerjee M. Propolis and commonly used intracanal irrigants: comparative evaluation of antimicrobial potential. *J Clin Pediatr Dent.* 2013;37(3):243-9.

Jones CG. Chlorhexidine: is it still the gold standard?. *Periodontol* 2000. 1997;15:55-62.

Jung IH, Lee DE, Yun JH, Cho AR, Kim CS, You YJ, Kim SJ, Choi SH. Anti-inflammatory effect of (-)-epigallocatechin-3-gallate on *Porphyromonas gingivalis* lipopolysaccharide-stimulated fibroblasts and stem cells derived from human periodontal ligament. *J Periodontal Implant Sci*. 2012;42(6):185-95.

Kato MT, Magalhães AC, Rios D, Hannas AR, Attin T, Buzalaf MA. Protective effect of green tea on dentin erosion and abrasion. *J Appl Oral Sci*. 2009 Nov-Dec;17(6):560-4.

Khamverdi Z, Rezaei-Soufi L, Kasraei S, Ronasi N, Rostami S. Effect of Epigallocatechin Gallate on shear bond strength of composite resin to bleached enamel: an in vitro study. *Restor Dent Endod*. 2013;38(4):241-7.

Khoo G, Zhan L, Hoover C, Featherstone JD. Cariogenic virulence characteristics of mutans streptococci isolated from caries-active and caries-free adults. *J Calif Dent Assoc*. 2005;33(12):973-80.

Kim BJ, Lee YK. Influence of the shade designation on the color difference between the same shade-designated resin composites by the brand. *Dental Materials* 2009;25:1148–54.
Knösel M, Reus M, Rosenberger A, Ziebolz D. A novel method for testing the veridicality of dental colour assessments. *Eur J Orthod*. 2012;34(1):19-24.

Kohler B, Bjarnason S. Mutans streptococci, lactobacilli and caries prevalence in 11- and 12-year-old Icelandic children. *Community Dent Oral Epidemiol*. 1987;15:332-5.

Kote S, Kote S, Nagesh L. Effect of pomegranate juice on dental plaque microorganisms (streptococci and lactobacilli). *Anc Sci Life*. 2011;31(2):49-51.
Kt S, Kmk M, N B, Jimson S, R S. Dental caries vaccine - a possible option? *J Clin Diagn Res*. 2013;7(6):1250-3.

Kudva P, Tabasum ST, Shekhawat NK. Effect of green tea catechin, a local drug delivery system as an adjunct to scaling and root planing in chronic periodontitis patients: A clinicomicrobiological study. *J Indian Soc Periodontol*. 2011;15(1):39-45.

Kwong B, Liu H, Irvine DJ. Induction of potent anti-tumor responses while eliminating systemic side effects via liposome-anchored combinatorial immunotherapy. *Biomaterials*. 2011;32(22):5134-47.

Lang, Niklaus P. and Brex, M. C. (1986), Chlorhexidine digluconate—an agent for chemical plaque control and prevention of gingival inflammation. *Journal of Periodontal Research*, 21: 74–89.

Lee P, Tan KS. Effects of Epigallocatechin gallate against *Enterococcus faecalis* biofilm and virulence. *Arch Oral Biol*. 2015 Mar;60(3):393-9.

Lee SH. Antimicrobial effects of herbal extracts on *Streptococcus mutans* and normal oral streptococci. *J Microbiol*. 2013;51(4):484-9.

Libanore DZ. Efeitos da terapia a laser de baixa intensidade (685 e 830 nm) na taxa de proliferação bacteriana e na cicatrização de feridas cutâneas em modelo animal. [Dissertação de Mestrado]. São Carlos: Universidade de São Paulo; 2008.

- Lindquist B, Emilson CG. Dental location of *Streptococcus mutans* and *Streptococcus sobrinus* in humans harboring both species. *Caries Res* 1991;25: 146–152.
- Liu J, Ling JQ, Wu CD. Cetylpyridinium chloride suppresses gene expression associated with halitosis. *Arch Oral Biol*. 2013;58(11):1686-91.
- Loesche WJ. Role of *Streptococcus mutans* in human dental decay. *Microbiol Rev*. 1986;50(4):353-80.
- Löe, H., Rindom Schiöutt, C., Glavind, L. and Karring, T. Two years oral use of chlorhexidine in man. *Journal of Periodontal Research*, 1976; 11:135–144.
- Magalhães AC, Wiegand A, Rios D, Hannas A, Attin T, Buzalaf MA. Chlorhexidine and green tea extract reduce dentin erosion and abrasion in situ. *J Dent*. 2009;37(12):994-8.
- Maltz M, Beighton D. Multidisciplinary research agenda for novel antimicrobial agents for caries prevention and treatment. *Adv Dent Res*. 2012 Sep;24(2):133
- Mankodi S, Bauroth K, Witt JJ, Bsoul S, He T, Gibb R, Dunavent J, Hamilton A. A 6-month clinical trial to study the effects of a cetylpyridinium chloride mouthrinse on gingivitis and plaque. *Am J Dent*. 2005;18 Spec No:9A-14A.
- Mankovskaia A, Lévesque CM, Prakki ACatechin-incorporated dental copolymers inhibit growth of *Streptococcus mutans*. *J Appl Oral Sci*. 2013;21(2):203-7.
- Mann, C. M., and J. L. Markham. A new method for determining the minimum inhibitory concentration of essential oils. *J. Appl. Microbiol*. 1998;84:538-544.
- Maruyama T, Tomofuji T, Endo Y, Irie K, Azuma T, Ekuni D, Tamaki N, Yamamoto T, Morita M. Supplementation of green tea catechins in dentifrices suppresses gingival oxidative stress and periodontal inflammation. *Arch Oral Biol*. 2011;56(1):48-53.
- Mathur S, Mathur T, Shrivastava R, Khatri R. Chlorhexidine: The gold standard in chemical plaque control. *Natl J Physiol Pharm Pharmacol* 2011;1(2):45-50.
- Mattos-Graner RO. Relação entre os níveis bucais de estreptococos do grupo mutans, alguns de seus fatores de virulência e a incidência de cárie dental em crianças de 12 a 30 meses de idade [Tese de Doutorado]. São Paulo: Universidade de São Paulo; 1999. 155p.
- Mayer, M. P. A. Avaliação do risco de cárie. *ABOPREV*, 1991;1(1):5-11.
- McCoy LC, Wehler CJ, Rich SE, Garcia RI, Miller DR, Jones JA. Adverse events associated with chlorhexidine use: results from the Department of Veterans Affairs Dental Diabetes Study. *J Am Dent Assoc*. 2008;139(2):178-83.
- Mehta S, Pesapathy S, Joseph M, Tiwari PK, Chawla S. Comparative evaluation of a herbal mouthwash (Freshol) with chlorhexidine on plaque accumulation, gingival inflammation, and salivary *Streptococcus mutans* growth. *J Int Soc Prev Community Dent*. 2013;3(1):25-8.
- Moran J, Addy M, Wade W. Determination of minimum inhibitory concentrations of commercial toothpastes using an agar dilution method. *J Dent*. 1988;16:27-31.

Moran J; Addy M. The antibacterial properties of some commercially available toothpaste in vitro. *Br. Dent. J* 1984; 10:156-75.

Moreira AD, Mattos CT, de Araújo MV, Ruellas AC, Sant'anna EF. Chromatic analysis of teeth exposed to different mouthrinses. *J Dent.* 2013 Nov;41 Suppl 5:e24-7

Moshrefi A. Chlorhexidine. *J West Soc Periodontol Periodontol Abstr.* 2002;50(1):5-9.

Motisuki C, Lima LM, Spolidorio DM, Santos-Pinto L. Influence of sample type and collection method on *Streptococcus mutans* and *Lactobacillus* spp. counts in the oral cavity. *Arch Oral Biol.* 2005;50(3):341-5.

Mouchrek JC Junior, Castro Nunes LH, Arruda CS, Rizzi CC, Mouchrek AQ2, Tavares RR, Tonetto MR, Bandeca MC, Filho EM. Effectiveness of Oral Antiseptics on Tooth Biofilm: A Study in vivo. *Contemp Dent Pract.* 2015;16(8):674-678.

Nagle DG, Ferreira D, Zhou YD. Epigallocatechin-3-gallate (EGCG): chemical and biomedical perspectives. *Phytochemistry.* 2006;67(17):1849-55.

Nakanishi T, Mukai K, Yumoto H, Hirao K, Hosokawa Y, Matsuo T. Anti-inflammatory effect of catechin on cultured human dental pulp cells affected by bacteria-derived factors. *Eur J Oral Sci.* 2010;118(2):145-50.

Narotzki B, Reznick AZ, Aizenbud D, Levy Y. Green tea: a promising natural product in oral health. *Arch Oral Biol.* 2012;57(5):429-35.

Narotzki B, Levy Y, Aizenbud D, Reznick AZ. Green tea and its major polyphenol EGCG increase the activity of oral peroxidases. *Adv Exp Med Biol.* 2013;756:99-104.

NCCLS. Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria That Grow Aerobically; Approved Standard- Sixth Edition. NCCLS document M7-A6 [ISBN 1-56238-486-4]. NCCLS, 940 West Valley Road, Suite 1400, Wayne, Pennsylvania 19087-1898 USA, 2003

Nelson-Filho P, Baptistussi M, Azevedo RVP, Souza-Gugelmin MCM, Ito IY. Prevalência de estreptococos do grupo mutans em saliva de escolares de 5 a 14 anos de idade, na cidade de Sertãozinho, Estado de São Paulo. *Rev FOB* 1996;4(1/2):83-7.

Nelson-Filho P, Faria G, da Silva RA, Rossi MA, Ito IY. Evaluation of the contamination and disinfection methods of toothbrushes used by 24- to 48-month-old children. *J Dent Child.* 2006;73(3):152.

Neturi RS, R S, B VS, Y SS, T CS, P SK. Effects of Green Tea on *Streptococcus mutans* Counts- A Randomised Control Trail. *J Clin Diagn Res.* 2014;8(11):ZC128-30.

Nogueira-Filho GR, Toledo S, Cury JA. Effect of 3 dentifrices containing triclosan and various additives. *Clin Periodontol.* 2000;27(7):494-8.

Novy P, Rondevaldova J, Kourimska L, Kokoska L. Synergistic interactions of epigallocatechin gallate and oxytetracycline against various drug resistant *Staphylococcus aureus* strains in vitro. *Phytomedicine.* 2013;20(5):432-5.

Ntie-Kang F, Lifongo LL, Mbaze LM, Ekwelle N, Owono LC, Megnassan E, Judson PN, Sippl W, Efange SM. Cameroonian medicinal plants: a bioactivity versus ethnobotanical survey and chemotaxonomic classification. *BMC Complement Altern Med*. 2013;26:13:147.

O'Brien WJ, Groh CL, Boenke KM. A new, small-color-difference equation for dental shades. *J Dent Res*. 1990;69:1762-4.

Osso D, Kanani N. Antiseptic mouth rinses: an update on comparative effectiveness, risks and recommendations. *J Dent Hyg*. 2013;87(1):10-8.

Ostrosky EA, Mizumoto MK, Lima MEL, Kaneko TM, Nishikawa SO, Freitas BR. Métodos de avaliação da atividade antimicrobiana e determinação da concentração mínima inibitória (CMI) de plantas medicinais. *Revista Brasileira de Farmacognosia* 2008;2(18):301-307.

Otake S, Makimura M, Kuroki T, Nishihara Y, Hirasawa M. Anticaries effects of polyphenolic compounds from Japanese green tea. *Caries Res*. 1991;25(6):438-43.

Palomino JC1, 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.

Parikh-Das AM, Sharma NC, Du Q, Charles CA. Superiority of essential oils versus 0.075% CPC-containing mouthrinse: a two-week randomized clinical trial. *J Clin Dent*. 2013;24(3):94-9.

Parwani SR, Parwani RN, Chitnis PJ, Dadlani HP, Prasad SV. Comparative evaluation of anti-plaque efficacy of herbal and 0.2% chlorhexidine gluconate mouthwash in a 4-day plaque regrowth study. *J Indian Soc Periodontol*. 2013;17(1):72-7.

Pasich E, Bialecka A, Marcinkiewicz J. Efficacy of taurine haloamines and chlorhexidine against selected oral microbiome species. *Med Dosw Mikrobiol*. 2013;65(3):187-96.

Paul S, Peter A, Pietrobon N, Hämmerle CH. Visual and spectrophotometric shade analysis of human teeth. *J Dent Res*. 2002;81(8):578-82.

Peixoto ITA, Enoki C, Ito IY, Matsumoto MAN, Nelson-Filho P. Evaluation of home disinfection protocols for acrylic baseplates of removable orthodontic appliances: a randomized clinical investigation. *American Journal of Orthodontics and Dentofacial Orthopedics*, 2009 (in press).

Pimenta FC, Marin JM, Uzeda M, Ito IY. Prevalence of mutans streptococci in 93 members from six Brazilian families. *Pesqui Odontol Bras*. 2001;15(3):181-6.

Pires-de-Souza FCP, Garcia LFR, Roselino LMR, Naves LZ. Color stability of silorane-based composites submitted to accelerated artificial ageing—An in situ study. *J Dent* 2011;39(Suppl1):18-24.

Pizzo G, Compilato D, Di Liberto B, Pizzo I, Campisi G. Effects of two essential oil mouthrinses on 4-day supragingival plaque regrowth: a randomized cross-over study. *Am J Dent*. 2013;26(3):156-60.

- Prabhakar J, Senthilkumar M, Priya MS, Mahalakshmi K, Sehgal PK, Sukumaran VG. Evaluation of antimicrobial efficacy of herbal alternatives (Triphala and green tea polyphenols), MTAD, and 5% sodium hypochlorite against *Enterococcus faecalis* biofilm formed on tooth substrate: an in vitro study. *J Endod*. 2010;36(1):83-6.
- Pradeep KK, Hegde AM. Lead exposure and its relation to dental caries in children. *J Clin Pediatr Dent*. 2013 Fall;38(1):71-4.
- Prasanth M. Antimicrobial efficacy of different toothpastes and mouthrinses: an in vitro study. *Dent Res J (Isfahan)*. 2011;8(2):85-94.
- Quirynen M, Soers C, Desnyder M, Dekeyser C, Pauwels M, van Steenberghe D. A 0.05% cetyl pyridinium chloride/0.05% chlorhexidine mouth rinse during maintenance phase after initial periodontal therapy. *J Clin Periodontol*. 2005;32(4):390-400.
- Rahman M, Kühn I, Rahman M, Olsson-Liljequist B, Möllby R. Evaluation of a scanner-assisted colorimetric MIC method for susceptibility testing of gram-negative fermentative bacteria. *Appl Environ Microbiol*. 2004;70(4):2398-403.
- Ramesh K, Kunjappan S, Ramesh M, Shankar S, Reddy S. Comparative evaluation of predictive value of three caries activity tests-snyder, lactobacillus count and cariostat in mixed dentition children with and without caries. *Journal of Pharmacy & Bioallied Sciences*. 2013;5(Suppl 1):S63-S68.
- Rey S, Anziani P, Seyfried M. High throughput screening of perfumery raw materials for antimicrobial properties. *Comb Chem High Throughput Screen*. 2014;17(7):614-22.
- Rogosa M, Mitchell JA, Wiseman RF. A selective medium for the isolation of oral and faecal lactobacilli. *J. Bact*. 1951;62:132-133.
- Rölla G, Melsen B. On the mechanism of the plaque inhibition by chlorhexidine. *J Dent Res*. 1975;54 Spec No B:B57-62.
- Ros-Llor I, Lopez-Jornet P. Cytogenetic analysis of oral mucosa cells, induced by chlorhexidine, essential oils in ethanolic solution and triclosan mouthwashes. *Environ Res*. 2014;132:140-5.
- Sabatini C, Campillo M, Aref J. Color stability of ten resin-based restorative materials. *J Esthet Restor Dent*. 2012;24:185-99.
- Saito K, Mori S, Date F, Ono M. Epigallocatechin gallate inhibits oxidative stress-induced DNA damage and apoptosis in MRL-Fas(lpr) mice with autoimmune sialadenitis via upregulation of heme oxygenase-1 and Bcl-2. *Autoimmunity*. 2014;47(1):13-22.
- Sánchez-Pérez L, Irigoyen-Camacho E, Sáenz-Martínez L, Zepeda Zepeda M, Acosta-Gío E, Méndez-Ramírez I. Stability of unstimulated and stimulated whole saliva flow rates in children. *Int J Paediatr Dent*. 2015.
- Santiago SL, Osorio R, Neri JR, Carvalho RM, Toledano M. Effect of the flavonoid epigallocatechin-3-gallate on resin-dentin bond strength. *J Adhes Dent*. 2013;15(6):535-40.
- Saraiva RMC. Atividade antibacteriana de plantas medicinais frente a bactérias multirresistentes e a sua interação com drogas antimicrobianas [Dissertação de Mestrado]. Belém: Instituto de Ciências da Saúde, Universidade Federal do Pará; 2012.

- Saravia ME, Nelson-Filho P, Silva RA, De Rossi A, Faria G, Silva LA, Emilson CG. Recovery of mutans streptococci on MSB, SB-20 and SB-20M agar media. *Arch Oral Biol*. 2013;58(3):311-6.
- Saravia ME, Nelson-Filho P, Ito IY, da Silva LA, da Silva RA, Emilson CG. Morphological differentiation between *S. mutans* and *S. sobrinus* on modified SB-20 culture medium. *Microbiol Res*. 2011;166(1):63-7.
- Sarin S, Marya C, Nagpal R, Oberoi SS, Rekhi A. Preliminary Clinical Evidence of the Antiplaque, Antigingivitis Efficacy of a Mouthwash Containing 2% Green Tea- A Randomised Clinical Trial. *Oral Health Prev Dent*. 2015;13(3):197-203.
- Sato S, Pedrazzi V, Guimarães Lara EH, Panzeri H, Ferreira de Albuquerque R Jr, Ito IY. Antimicrobial spray for toothbrush disinfection: an in vivo evaluation. *Quintessence Int*. 2005;36(10):812-6.
- Seki M, Yamashita Y, Shibata Y, Torigoe H, Tsuda H, Maeno M. Effect of mixed mutans streptococci colonization on caries development. *Oral Microbiol Immunol*. 2006;21(1):47-52.
- Seneviratne CJ, Zhang CF, Samaranayake LP. Dental plaque biofilm in oral health and disease. *Chin J Dent Res* 2011;14:87-9
- Sharma R, Reddy VK, Prashant G, Ojha V, Kumar NP. Antimicrobial and anti-adherence activity of various combinations of coffee-chicory solutions on *Streptococcus mutans*: An in-vitro study. *J Oral Maxillofac Pathol*. 2014;18(2):201-6.
- Shi XC, Ma H, Zhou JL, Li W. The effect of cold-light-activated bleaching treatment on enamel surfaces in vitro. *Int J Oral Sci* 2013;4:208-13.
- Shin YS, Seo JY, Oh SH, Kim JH, Kim ST, Park YB, Moon HS. The effects of ErhBMP-2-/EGCG-coated BCP bone substitute on dehiscence around dental implants in dogs. *Oral Dis*. 2014;20(3):281-7.
- Shklair IL, Keene HJ. A biomechanical scheme for the separation of the Five varieties of *Streptococcus mutans*. *Arch Oral Biol* 1974;19:1079-81.
- Sinha A, Nosoudi N, Vyavahare N. Elasto-regenerative properties of polyphenols. *Biochem Biophys Res Commun*. 2014 Feb 7;444(2):205-11.
- Sjöblom M, Ainamo A, Ainamo J. Antimicrobial effect of four different toothpastes. *Scand J Dent Res*. 1976;84(6):377-80.
- Smith CF, Townsend DE. A new medium for determining the total plate count in food. *J. Food Prot*. 1999;62:1404-1410.
- Soares DN, Antonio AG, Iorio NL, Pierro VS, dos Santos KR, Maia LC. Does the presence of sucrose in pediatric antibiotics influence the enamel mineral loss and the *Streptococcus mutans* counts in dental biofilm? *Braz Dent J*. 2015;26(3):249-57.
- Stookey GK, Beiswanger B, Mau M, Isaacs RL, Witt JJ, Gibb R. A 6-month clinical study assessing the safety and efficacy of two cetylpyridinium chloride mouthrinses. *Am J Dent*. 2005;18 Spec No:24A-28A.

Subramaniam P, Eswara U, Maheshwar Reddy KR. Effect of different types of tea on *Streptococcus mutans*: an in vitro study. *Indian J Dent Res*. 2012;23(1):43-8.

Supranoto SC, Slot DE, Addy M, Van der Weijden GA. The effect of chlorhexidine dentifrice or gel versus chlorhexidine mouthwash on plaque, gingivitis, bleeding and tooth discoloration: a systematic review. *Int J Dent Hyg*. 2015;13(2):83-92.

Suzuki Y, Isemura M. Binding interaction between (-)-epigallocatechin gallate causes impaired spreading of cancer cells on fibrinogen. *Biomed Res*. 2013;34(6):301-8.

Tamura M, Saito H, Kikuchi K, Ishigami T, Toyama Y, Takami M, Ochiai K. Antimicrobial activity of Gel-entrapped catechins toward oral microorganisms. *Biol Pharm Bull*. 2011;34(5):638-43.

Tarahovsky YS, Kim YA, Yagolnik EA, Muzafarov EN. Flavonoid-membrane interactions: Involvement of flavonoid-metal complexes in raft signaling. *Biochim Biophys Acta*. 2014 Jan 26.

Tarasingh P, Reddy JS, Suhasini K, Hemachandrika I. Comparative Evaluation of Antimicrobial Efficacy of Resin-Modified Glass Ionomers, Compomers and Giomers - An Invitro Study. *J Clin Diagn Res*. 2015;9(7):ZC85-7.

Taylor PW, Hamilton-Miller JM, Stapleton PD. Antimicrobial properties of green tea catechins. *Food Sci Technol Bull*. 2005;2:71-81

Teixeira KI, Denadai AM, Sinisterra RD, Cortés ME. Cyclodextrin modulates the cytotoxic effects of chlorhexidine on microorganisms and cells in vitro. *Drug Deliv*. 2014 Feb 4.

Tenenbaum H, Dahan M, Soell M. Effectiveness of a sanguinarine regimen after scaling and root planing. *J Periodontol*. 1999;70(3):307-11.

Tenore GC, Daglia M, Ciampaglia R, Novellino E. Exploring the nutraceutical potential of polyphenols from black, green and white tea infusions - an overview. *Curr Pharm Biotechnol*. 2015;16(3):265-71.

Tenuta LM, Cury JA. Laboratory and human studies to estimate anticaries efficacy of fluoride toothpastes. *Monogr Oral Sci*. 2013;23:108-24.

Torres AS, Pizzolitto AC, Elias AM, Ito IY. *Estreptococos do grupo mutans: avaliação do ágar SB-20 e MSB na determinação de ufc na saliva e na placa dental de adolescentes*. *Rev Bras Odontol* 1993;50:18-21.

Tulsani SG, Chikkanarasaiah N, Siddaiah SB, Krishnamurthy NH. The effect of Propolis and Xylitol chewing gums on salivary *Streptococcus mutans* count: a clinical trial. *Indian J Dent Res*. 2014;25(6):737-41.

Twetman S. Antimicrobials in future caries control? A review with special reference to chlorhexidine treatment. *Caries Res* 2004;38:223-229.

Uchiyama Y, Suzuki T, Mochizuki K, Goda T. Dietary Supplementation with a Low Dose of (-)-Epigallocatechin-3-Gallate Reduces Pro-Inflammatory Responses in Peripheral Leukocytes of Non-Obese Type 2 Diabetic GK Rats. *J Nutr Sci Vitaminol (Tokyo)*. 2013;59(6):541-7.

Van Leeuwen M, Rosema N, Versteeg P, Slot D, Van Winkelhoff A, Van der Weijden G. Long-term efficacy of a 0.07% cetylpyridinium chloride mouth rinse in relation to plaque and gingivitis: a 6-month randomized, vehicle-controlled clinical trial. *Int J Dent Hyg*. 2015;13(2):93-103.

Van Leeuwen MP, Slot DE, Van der Weijden GA. The effect of an essential-oils mouthrinse as compared to a vehicle solution on plaque and gingival inflammation: a systematic review and meta-analysis. *Int J Dent Hyg*. 2014;12(3):160-7.

Van Rijkom HM, Truin GJ, van 't Hof MA. A meta-analysis of clinical studies on the caries-inhibiting effect of chlorhexidine treatment. *J Dent Res*. 1996;75(2):790-5.

Varoni E, Tarce M, Lodi G, Carrassi A. Chlorhexidine (CHX) in dentistry: state of the art. *Minerva Stomatol* 2012;61:399-419.

Volokhov DV, Amselle M, Beck BJ, Popham DL, Whittaker P, Wang H, Kerrigan E, Chizhikov VE. *Lactobacillus brantae* sp. nov., isolated from faeces of Canada geese (*Branta canadensis*). *Int J Syst Evol Microbiol*. 2012;62(Pt 9):2068-76.

Wang F, Chang Z, Fan Q, Wang L. Epigallocatechin-3-gallate inhibits the proliferation and migration of human ovarian carcinoma cells by modulating p38 kinase and matrix metalloproteinase-2. *Mol Med Rep*. 2014;9(3):1085-9.

Wang T, Zhou H, Xie H, Mu Y, Xu Y, Liu J, Zhang X. Epigallocatechin-3-gallate inhibits TF and TNF- α expression induced by the anti- β 2GPI/ β 2GPI complex in human THP-1 cells. *Int J Mol Med*. 2014;33(4):994-1002.

Wen WC, Kuo PJ, Chiang CY, Chin YT, Fu MM, Fu E. Epigallocatechin-3-gallate. Attenuates *Porphyromonas Gingivalis* Lipopolysaccharide-enhanced Matrix Metalloproteinase-1 Production Through an Inhibition of Interleukin-6 in Gingival Fibroblasts. 2014;85(6):868-75.

Whittenbury R. Hydrogen peroxide formation and catalase activity in the lactic acid bacteria. *J Gen Microbiol* 1964; 35:13-26.

Xu X, Zhou XD, Wu CD. Tea catechin epigallocatechin gallate inhibits *Streptococcus mutans* biofilm formation by suppressing *gtf* genes. *Arch Oral Biol*. 2012;57(6):678-83.

Yang F, de Villiers WJ, McClain CJ, Varilek GW. Green tea polyphenols block endotoxin-induced tumor necrosis factor-production and lethality in a murine model. *J Nutr*. 1998;128(12):2334-40.

Yannikakis SA, Zissis AJ, Polyzois GL, Caroni C. Color stability of provisional resin restorative materials. *J Prosthet Dent*. 1998;80:533-9.

Yoncheva K, Momekov G. Antiangiogenic anticancer strategy based on nanoparticulate systems. *Expert Opin Drug Deliv*. 2011;8(8):1041-56.

Yousaf S, Butt MS, Suleria HA, Iqbal MJ. The role of green tea extract and powder in mitigating metabolic syndromes with special reference to hyperglycemia and hypercholesterolemia. 2014;5(3):545-56.

Zhang S. Dental Caries and Vaccination Strategy against the Major Cariogenic Pathogen, *Streptococcus mutans*. *Curr Pharm Biotechnol*. 2014;14(11):960-6.

Zhou J, Farah BL, Sinha RA, Wu Y, Singh BK, Bay BH, Yang CS, Yen PM. Epigallocatechin-3-Gallate (EGCG), a Green Tea Polyphenol, Stimulates Hepatic Autophagy and Lipid Clearance. *PLoS One*. 2014;29;9(1):e87161.

Anexos

ANEXO A – ESPECIFICAÇÕES DO FABRICANTE DA EGCG

3050 Spruce Street
 Saint Louis, Missouri 63103 USA
 Telephone 800-325-5832 • (314) 771-5765
 Fax (314) 286-7828
 email: techserv@sial.com
 sigma-aldrich.com

Product Information

(-)-EPIGALLOCATECHIN GALLATESigma Prod. No. **E4143**

Store at 2-8° C

CAS NUMBER: 989-51-5

SYNONYM: (2R,3R)-2-(3,4,5-Trihydroxyphenyl)-3,4-dihydro-1(2H)-benzopyran-3,5,7-triol 3-(3,4,5-trihydroxybenzoate); (-)-Epigallocatechin 3-O-gallate¹; EGCG¹

PHYSICAL DESCRIPTION:

Appearance: powder

Molecular formula: C₂₂H₁₈O₁₁

Molecular weight: 458.4

Melting point: 218°C¹E^M(275 nm) = 11,500 (ethanol)¹Optical rotation: -185° ± 2° (ethanol)¹ **STORAGE / STABILITY AS SUPPLIED:****SOLUBILITY:**

This is soluble in water at least to 5 mg/mL, giving a clear faint yellow solution. The stability of a solution of this product in water at a concentration of 0.3 mg/mL was tested. A sample left for 2.5 hours at room temperature was found to have significantly decreased in purity (from 99.6% to 81.7%, by HPLC). A sample left for 2 hours at 4°C was found to have decreased only slightly (from 99.5% to 99.3%).

GENERAL NOTES:

Epigallocatechin gallate (EGCG) is a polyphenolic compound found in green tea leaves. Studies with EGCG indicate it has antitumor promoting activity.^{1,2}

METHOD OF PREPARATION:

It is isolated by extracting the tea leaves with hot water, back-extracted with ethyl acetate. The EGCG is chromatographically isolated from the organic phase.³

(-)-EPIGALLOCATECHIN GALLATE

Sigma Prod. No. **E4143**

HPLC SYSTEM:⁴

Column: YMC ODS-A 15 cm x 4.6 mm ID Particle size 5 µm
Mobile phase: acetonitrile:ethyl acetate:0.05% H₃PO₄ (12:2:86)
Flow rate: 1.0 mL/min
Solvent: Product dissolved at 0.3 mg/mL in water, 20 µL injected
Detection at 280 nm
Retention time for major peak ~12 minutes

Determination of this compound in plasma and urine by HPLC has been reported.⁵

REFERENCES:

1. *Merck Index*, 12th ed., #3568 (1996).
2. Yamane, T. et al., *Cancer Res.*, 55, 2081 (1995).
3. Supplier information.
4. Sigma quality control.
5. Lee, M.-J. et al., *Cancer Epidemiol. Biomark. Prev.*, 4, 393 (1995).

Sigma warrants that its products conform to the information contained in this and other Sigma-Aldrich publications. Purchaser must determine the suitability of the product(s) for their particular use. Additional terms and conditions may apply. Please see reverse side of the invoice or packing slip.

ANEXO B – APROVAÇÃO PELO COMITÊ DE ÉTICA

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE RIBEIRÃO PRETO
Comitê de Ética em Pesquisa

DECLARAÇÃO

DECLARAMOS, atendendo a requerimento da interessada e de acordo com os registros deste Comitê, que o Projeto de Pesquisa intitulado "**Estudo *in vivo* e *in vitro* da eficácia de uma nova formulação antimicrobiana para crianças e da alteração de cor causada após sua aplicação em dentes decíduos e permanentes**" - CAAE nº **45863115.5.0000.5419**, sob a responsabilidade da Profa. Dra. Andiara De Rossi Daldegan, foi submetido para avaliação do Comitê de Ética em Pesquisa desta Faculdade, via Plataforma Brasil, tendo sido o desenvolvimento do Projeto de Pesquisa aprovado na 182ª Sessão Ordinária do CEP, realizada em 29/07/2015.

Ribeirão Preto, 13 de agosto de 2015.

Profa. Dra. Simone Cecílio Hallak Regalo
Coordenadora do CEP/FORP

ANEXO C – TERMOS DE CONSENTIMENTO E ASSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE RIBEIRÃO PRETO

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

(Capítulo IV, itens 1 a 3 da Resolução 466/2012 – Conselho Nacional de Saúde)

Nós, Pós-graduanda Marina Moscardini Vilela e Prof^a. Andiar De Rossi, pesquisadores responsáveis pelo projeto “Estudo *in vivo* e *in vitro* da eficácia de uma nova formulação antimicrobiana para crianças e da alteração de cor causada após sua aplicação em dentes decíduos e permanentes”# estamos convidando o (a) participante da pesquisa (a) _____ RG _____, sob responsabilidade de _____, RG: _____, CPF _____ a participar desse estudo que será realizado na Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto - Universidade de São Paulo.

O objetivo do estudo será ver se uma substância tirada do chá verde (bebida que tomamos) pode matar as bactérias que causam cárie dental. Isso porque a substância que usamos hoje para bochechar e matar as bactérias (Periogard) pode manchar os dentes e restaurações, mudar o gosto dos alimentos e machucar os tecidos da nossa boca (como a gengiva) se usada por muitos dias.

Para nosso estudo a criança deve cuspir um pouquinho de saliva (2 mL) em um potinho, bochechar a nova substância feita de chá verde, ou água ou Periogard (que já está a venda no comércio), pelo tempo de 1 minuto e depois cuspir novamente a saliva (2 mL). Os potinhos com saliva serão levados ao laboratório para contar as bactérias que existiam antes e depois do bochecho.

Em seguida as crianças receberão todo o tratamento odontológico necessário que pode incluir instruções de alimentação e higiene da boca, remoção de placa e de cálculo com profilaxia (limpeza dos dentes), restauração com material de obturação da cor do dente, aplicação de flúor, extração (remoção de dentes), tratamento de canal, caso seja necessário e outros. Ainda, o bochecho pode diminuir e matar as bactérias de sua boca que causam cárie. E se essa substância for realmente boa, toda a população poderá usar esse novo produto e vocês também serão avisados para poder usar o produto.

Todos os procedimentos serão acompanhados pelos pesquisadores. Estes se comprometem a prestar assistência necessária aos participantes, se houver algum problema relacionado ao tratamento, pelo tempo que for necessário, até a resolução do problema. Esse estudo não oferece nenhum risco à saúde da criança, pois se trata de uma substância natural que está presente no chá verde, bebida que as pessoas tomam com frequência, e apresenta muitos efeitos bons para a saúde, protegendo contra doenças do coração, da pressão, do sistema nervoso e de doenças causadas por microrganismos.

Os responsáveis legais têm a garantia de que receberão respostas a qualquer pergunta e esclarecimentos de qualquer dúvida antes, durante e após a realização da pesquisa. Qualquer problema relacionado à pesquisa deverá entrar em contato o mais breve possível com Marina Moscardini Vilela pelo telefone (19) 991815232.

Os responsáveis podem recusar a participação da criança na pesquisa a qualquer momento, sem nenhuma penalização ou prejuízo, e isso não irá causar prejuízo no seu tratamento. Assim não será permitida a continuação da pesquisa nesse participante.

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE RIBEIRÃO PRETO

TERMO DE ASSENTIMENTO & Resolução nº 66/2012 & NS

Assino este documento de livre e espontânea vontade, pois concordo com o seu conteúdo.

Assinatura do participante da pesquisa: Marina Moscardini de Azeite

RG: _____

CPF: 400.444.338-59

CPF: _____

&

&

Assinatura do responsável legal pela criança: Profª Andriana De Rossi

RG: _____

CPF: 288.258.688-47

CPF: _____

ANEXO D – FICHA PARA DETERMINAÇÃO DO RISCO E ATIVIDADE DE CÁRIE DENTAL

AVALIAÇÃO DO RISCO E ATIVIDADE DA DOENÇA CÁRIE

1. FATORES RELACIONADOS AO HOSPEDEIRO

- Dentição () Decídua () Mista () Permanente
- Arco Dental () Tipo I de Baume () Tipo II de Baume
- Padrão das fossas e fissuras () Profundas () Rasas
- Apinhamento Dental () Presente () Ausente
- Selantes de fossas e fissuras () Presentes - Satisfatórios () Não () Sim () Ausentes
- Hábitos de higiene bucal: Número de escovações/dia: _____
 Períodos: _____
 Uso de fio dental () Sim () Não
 Quem escova () Criança () Responsável () Ambos
- Fluxo e capacidade tampão salivar (solicitar quando necessário) _____
- * Exposição aos Fluoretos
 - Flúoreto pré-natal () Não () Sim – Posologia: _____
 - Flúoreto na água de abastecimento público () Sim () Não
- Aplicações tópicas de fluoretos () Não () Sim - Data _____
 - Bochechos com soluções fluoretadas () Não () Sim – Concentração ____
 - Dentifrícios fluoretados () Não () Sim – Concentração _____
- * Uso de Agentes Antimicrobianos
 - Clorexidina () Não () Sim – Frequência: _____
 - Outros: _____
- * Doenças Sistêmicas () Não () Sim - Qual? _____
- * Uso crônico de Medicamentos que reduzem o fluxo salivar ou que contêm açúcar (xaropes)
 () Não () Sim - Qual _____

2. FATORES RELACIONADOS À DIETA

- Frequência de ingestão de alimentos açucarados () Às refeições () Entre as refeições
- Amamentação noturna no seio materno () Não () Sim - Frequência _____
- Dorme na cama com a mãe () Não () Sim
- Faz uso de mamadeira noturna () Não () Sim
 Composição da mamadeira _____
- Realiza higiene bucal após as mamadas noturnas () Não () Sim
- Consome, em alta frequência

- () chicletes () refrigerantes () catchup
 () balas () sucos de frutas () chips
 () chocolates () bolachas () todinho
 () outros: _____

3. EXAME CLÍNICO

- Número de manchas brancas ativas _____ () superfícies lisas () superfícies oclusais
- Número de lesões de cárie com cavitação _____ () superfícies lisas () superfícies oclusais
- Cor e consistência das lesões de cárie _____
- Número de superfícies dentais restauradas _____

4.1. ÍNDICE DE HIGIENE ORAL SIMPLIFICADO (IHO-S)

Índice de Greene e Vermillion Simplificado (1964)

1- Atribuir escores de 0 a 3 para biofilme e cálculo dental nas faces dos dentes indicados na tabela

Dente*/Face	Biofilme Dental (0-3)	Cálculo Dental (0-3)
16 V (ou 55)		
11 V (ou 51)		
26 V (ou 65)		
36 L (ou 75)		
31 V (ou 71)		
46 L (ou 85)		
IHO= Soma ÷ 6		

* Apenas dentes totalmente irrompidos. Na ausência substituir pelo dente adjacente

2- IHO= Soma dos escores ÷ número de dentes avaliados (6)

3- Resultados: **0-1:**Satisfatório **1,1-2:** Regular **2,1-3:** Deficiente **>3,1:** Muito ruim

CLASSIFICAÇÃO DO RISCO/ATIVIDADE DA DOENÇA CÁRIE

- () alto risco () alta atividade
 () médio risco () média atividade
 () baixo risco () baixa atividade