

UNIVERSIDADE FEDERAL DO MARANHÃO
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ODONTOLOGIA
MESTRADO

**POTENCIAL ANTICARIOGÊNICO de *Anacardium
occidentale* Linn e *Psidium guajava* Linn EM BIOFILME
DE *Streptococcus mutans***

SÃO LUÍS

2016

ALLANA DA SILVA E SILVA DIAS

POTENCIAL ANTICARIOGÊNICO de *Anacardium occidentale* Linn e *Psidium guajava* Linn EM BIOFILME DE *Streptococcus mutans*

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Odontologia como parte dos requisitos para a obtenção do título de Mestre em Odontologia.

Orientadora: Silvana Amado Libério Pereira

Coorientador: Tarcísio Jorge Leitão de Oliveira

SÃO LUÍS

2016

Silva, Allana da Silva e.

Potencial anticariogênico de *Anacardium occidentale* Linn e *Psidium guajava* Linn e biofilme de *Streptococcus mutans* / Allana da Silva e Silva. — São Luís, 2016.

60 f.

Orientador: Silvana Amado Libério Pereira.

Co-orientador: Tarcísio Jorge Leitão de Oliveira

Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal do Maranhão, Programa de Pós-Graduação em Odontologia, 2016.

1. Cárie dentária. 2. *Anacardium occidentale*. 3. *Psidium guajava*. 4. *Streptococcus mutans*. 5. Biofilme dental. 6. Fitoterapia. I. Título.

CDU 616.314-002:615.32

ALLANA DA SILVA E SILVA DIAS

POTENCIAL ANTICARIOGÊNICO de *Anacardium occidentale* Linn e *Psidium guajava* Linn EM BIOFILME DE *Streptococcus mutans*

A Comissão julgadora da Defesa do Trabalho Final de Mestrado em Odontologia, em sessão pública realizada no dia / / , considerou a candidato(a).

() APROVADO

() REPROVADO

- 1) Examinadora: Prof. Dra. Rubenice Amaral da Silva
- 2) Examinadora: Prof. Dra. Leticia Machado Gonçalves
- 3) Presidente (Orientadora): Prof. Dra. Silvana Amado Libério Pereira

*“Combati o bom combate,
terminei a corrida, guardei a fé”.*

2 Tm 4,7

AGRADECIMENTOS

A Deus por me presentear com o dom da vida, por me conceder saúde para trilhar essa etapa e fé para nunca abandonar o percurso, mesmo quando tudo pareceu sem rumo. Obrigada por ser minha fortaleza, meu refúgio, torre forte onde eu posso descansar, onde entrego os meus fardos. Sem tua mão a me sustentar e me guiar eu nada sou!

Aos meus pais, meus primeiros incentivadores para essa jornada. Ao meu pai Nunes, por todos os puxões de orelha, por todos os gestos de amor e carinho e por sempre dizer que andaria o ano todo com a mesma roupa, mas que a prioridade seria sempre o estudo. A minha mãe Glória, por ser minha melhor amiga, por me dar os melhores conselhos, por suportar meus estresses e ansiedade, por ser meu alento nas noites traiçoeiras, por deixar de viver seus sonhos para viver os meus. Essa vitória eu devo a vocês, obrigada por financiarem meus estudos e sempre acreditarem em mim. Amo vocês!

A minha irmã, Amanda, pelos sábios conselhos durante essa jornada. Por muitas vezes em que ela foi minha psicóloga, que ouviu meus lamentos e comemorou as vitórias. Obrigada por todas as vezes que me fez parar e refletir, mudar o rumo e persistir. Obrigada por essa mansidão que contagia a todos. Amo você!

Ao meu namorado Felipe, muito mais que namorado, um amigo, meu grande incentivador, que me deu conselhos quando eu quis sucumbir, que suportou meu estresse calado, que entendeu muitas vezes minha ausência. Obrigada pela sua simplicidade e alegria de viver que me contagiam, pelo ombro amigo e por nunca me deixar abater.

A minha orientadora e amiga Silvana Amado Libério, meu exemplo de vida e mestre. Minha orientadora desde a iniciação científica. Aquela que me plantou a semente da pesquisa, que me ensinou a redigir projetos, relatórios, banners, artigos, que me colocou dentro de um laboratório, que me mostrou como devia ser feito, que me fiscalizou e por fim, me deixou voar. Obrigada pelas vezes que me recebeu em horários fora do trabalho, na sua casa, no seu consultório, por todos os puxões de orelha e elogios. Aquela que nunca deixou de responder minhas mensagens, e-mails e nunca deixou de retornar minhas ligações. Uma orientadora presente,

eficiente e bastante criteriosa. Obrigada por moldar meu caráter quanto aluna, pesquisadora e futura professora. Minha vida acadêmica eu devo a você!

Ao meu co-orientador Tarcísio Jorge Leitão de Oliveira, professor novo na casa, mas cheio de ideias e de vontade de trabalhar. Aquele professor estilo agoniado, mas que é tão inteligente, que nosso raciocínio não consegue acompanhar. Obrigada por toda paciência que teve comigo, pelas cobranças, pelas vezes que teve que sentar, escrever e desenhar coisas bobas, pelas vezes que teve que largar seus afazeres e me acompanhar no laboratório. Desenvolver essa pesquisa na nossa estrutura não foi fácil, mas seu conhecimento e persistência, tornou possível. Creio que a Odontologia vai crescer muito com sua contribuição. Obrigada por todo conhecimento transmitido!

À professora Flávia Amaral, nossa parceira de estudos que envolvem produtos naturais. Por nunca nos negar a produção do extrato, por nos receber sempre que necessário, por colocar seus alunos a nossa disposição. Sem a parceria do seu laboratório esse estudo e todos os demais que fizemos, não teriam sido realizados. Obrigada por me seduzir com a fitoterapia!

Às professoras Érika Pereira e Maria Carmen, aquelas que mais que professoras, são amigas, que muitas vezes escutaram meu desabafo, me deram conselhos e me contagiam com sua alegria. Nos momentos mais difíceis, foram vocês que me ajudaram a reerguer e voltar à luta. Obrigada por todo riso fácil!

À professora Rubenice Amaral, pioneira em estudar *Anacardium occidentale* no curso de Odontologia da Universidade Federal do Maranhão- UFMA. Obrigada por todas as dúvidas esclarecidas, por todo conhecimento transmitido, pelos puxões de orelha, pelo estímulo a pesquisa. A senhora conhece caju como ninguém!

A todos os professores da Pós-graduação em Odontologia que fizeram parte da minha formação. Obrigada por todas as críticas, elogios e broncas. Reconheço que tudo que me falaram foi para engrandecer minha formação enquanto professora. Levo traços de vocês comigo!

À professora Letícia Gonçalves, que nos recebeu, esclareceu dúvidas e executou a análise estatística deste trabalho. Obrigada pelo apoio!

À aluna de graduação, Juliana Campos, minha fiel escudeira e parceira de laboratório. Aquele que me acompanhou e me ajudou (muito) desde o início da pesquisa. Aquele que foi comigo nos fins de semana, que me fez rir quando eu quis me desesperar. Uma aluna de graduação com responsabilidade e senso crítico que

muitos alunos de pós-graduação não têm. Obrigada pela amizade, por todo conhecimento compartilhado, por estar ao meu lado sempre. Ju, seu futuro é brilhante!

À aluna de mestrado de Ciências da Saúde, Jéssyca Wan Lume, a responsável pela produção de todos os extratos utilizados nesse trabalho. Aquela que me recebeu para explicar sobre o mecanismo de ação, que nunca negou a produção de extrato, que deixou de fazer suas coisas para moer e macerar os extratos, que riu de mim quando eu precisava de mais. Foram várias idas e vindas ao laboratório de Fitofármacos e ela sempre disposta a ajudar. Jéssyca, você ama o que faz, você vai longe!

Ao técnico do laboratório de microbiologia Ivaldo, obrigada por me ensinar sempre com o sorriso no rosto. Obrigada por todas as vezes que sentou para fazer cálculos comigo, que me acompanhou na produção de meios, que fez curvas de calibração. Muitas vezes, fizeste o papel de professor. Obrigada pela disposição e cuidado!

Aos meus colegas de turma, que me acompanharam nesta jornada, por dividirem os medos e ansiedades, pelas viagens a congressos, pelos momentos de brigas e alegrias. Seremos mestres!

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Nível Superior- CAPES que me forneceu o auxílio financeiro para trilhar esse tão sonhado caminho.

À Fapema pelo apoio aos projetos, o que tornou possível a compra de todo material utilizado nesta pesquisa.

RESUMO

A cárie continua a ser um grave problema de saúde pública no Brasil e no mundo, e o quadro ainda é mais grave quando se considera as desigualdades entre as regiões geográficas. Para prevenção da doença cárie o controle mecânico do biofilme é a prática mais consagrada, entretanto, pode ser feita de maneira inadequada, necessitando do controle químico adjuvante. Os produtos naturais aparecem como opção em formulações, pois produzem metabólitos secundários com atividade comprovada contra cepas bucais. *Anacardium occidentale* L e *Psidium guajava* L. aparecem como algumas das plantas mais representativas em estudos etnofarmacológicos, são de fácil acesso, encontradas em abundância principalmente na região Nordeste e capazes de interferir em cepas bacterianas da cavidade bucal. Entretanto, na dinâmica do biofilme, estudos são escassos. Assim, o objetivo deste estudo foi avaliar *in vitro* a capacidade dos extratos hidroalcóolicos da casca de *Anacardium occidentale* L. e folhas de *Psidium guajava* L. de interferir nas propriedades cariogênicas do biofilme e desmineralização do esmalte dentário com o uso de modelo de biofilme *Streptococcus mutans*. Os extratos foram obtidos por maceração em etanol à 70%, secos e ressuspensos em água destilada, na proporção de 1:10. Para os testes *in vitro*, os extratos foram ressuspensos em água destilada estéril e filtrados em filtro de membrana. Inicialmente foi determinada a Concentração Bactericida Mínima (CBM) para definir a concentração que seria utilizada no biofilme. Os biofilmes foram então formados sobre blocos de esmalte bovinos e expostos 8 vezes/dia por 1 minuto à solução de sacarose à 10%. Após 48 horas de crescimento, o biofilme foi tratado 2 vezes/dia por um dos seguintes tratamentos: G1, extrato da casca de *Anacardium occidentale* 200 mg/mL; G2, extrato da folha de *Psidium guajava* 200 mg/mL; G3, NaCl 0,9%; G4, clorexidina 0,12%; G5, NaF 0,05%. Após três dias de tratamento, os biofilmes foram coletados para quantificação de viabilidade bacteriana, biomassa e da concentração de polissacarídeos extra e intracelulares. A desmineralização do esmalte foi estimada por microdureza pela porcentagem de perda de desmineralização (%PDS). Os resultados foram analisados estatisticamente por ANOVA com nível de significância fixado em 5%. A CBM para ambos os extratos foi de 50 mg/mL. Em relação ao pH, *Psidium guajava* diferiu do NaCl após as 96 e 120 horas ($p < 0,05$). Para viabilidade bacteriana, *Psidium guajava* apresentou médias menores do que o NaCl ($p < 0,05$),

o que não ocorreu com *Anacardium occidentale* ($p > 0,05$). Na análise de perda mineral, *Anacardium occidentale* respondeu semelhante a CHX e ao NaF ($p < 0,05$). Para os polissacarídeos extracelulares insolúveis, ambos os extratos diferiram do NaCl ($p < 0,05$), mas não entre si. Dessa forma, os extratos da casca de *Anacardium occidentale* e folha de *Psidium guajava*, são capazes de interferir na dinâmica do biofilme cariogênico.

Palavras-chave: Cárie dentária. Biofilmes. *Streptococcus mutans*. Fitoterapia.

ABSTRACT

Caries remains a major public health problem in Brazil and worldwide, and the picture is even more serious when considering inequalities between geographical regions. In order to prevent caries, mechanical control of the biofilm is the established practice, however, since it can be done improperly, it requires an adjuvant chemical control. Natural products appear as an option in formulations, since they produce secondary metabolites with proven activity against oral strains. *Anacardium occidentale* L and *Psidium guajava* L., which appear as some of the most representative plants in ethnopharmacological studies, are easily accessible, found in abundance mainly in the Brazilian Northeast and able to interfere with bacterial strains of the oral cavity. However, there are few studies regarding their action in the dynamics of biofilm. The objective of this study was to evaluate in vitro the ability of hydroalcoholic extract of *Anacardium occidentale* L. bark and *Psidium guajava* L. leaves to interfere with cariogenic properties of biofilms and demineralization of tooth enamel, using a *Streptococcus mutans* biofilm model. Extracts were obtained by maceration in 70% ethanol, dried and resuspended in distilled water, at a ratio of 1:10. For in vitro tests, the extracts were resuspended in sterile distilled water and filtered on filter membranes. Initially, we determined the Minimum Bactericidal Concentration (MBC) for defining the concentration that would be used in the biofilm. The biofilms were then formed on bovine enamel blocks and exposed to sucrose solution at 10% 8 times/day for 1 minute. After 48 hours of growth, the biofilm was treated 2 times/day with the following treatments: G1, *Anacardium occidentale* bark extract 200 mg/ml; G2, *Psidium guajava* leaf extract 200 mg/mL; G3, 0.9% NaCl; G4, chlorhexidine 0.12%; G5, 0.05% NaF. After three days of treatment, the biofilms were collected for quantification of bacterial viability, biomass and concentration of extra and intracellular polysaccharides. Enamel demineralization was estimated by microhardness by the percentage of demineralization loss (% PDL). The results were statistically analyzed by ANOVA with significance level set at 5%. MBC to both extracts was 50 mg/ml. For the pH *Psidium guajava* extract was only able to differ from the negative control after 96 hours and 120 hours ($p < 0.05$). For bacterial viability, *Psidium guajava* showed an average statistically lower than the negative control ($p < 0.05$). When analyzed mineral loss, *Anacardium occidentale* was able to reduce such mineral loss similarly to chlorhexidine 0.12% and 0.05% NaF ($p < 0.05$).

For insoluble extracellular polysaccharides, *Anacardium occidentale* and *Psidium guajava* differed from the negative control ($p < 0.05$), but not between each other. Thus, extracts of the bark of *Anacardium occidentale* and *Psidium guajava* leaf, are able to interfere with the dynamics of cariogenic biofilm.

Keywords: Dental caries. Biofilms. *Streptococcus mutans*. Phytotherapy.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	14
2. CAPÍTULO I	19
3. CONSIDERAÇÕES FINAIS	41
REFERÊNCIAS	42
ANEXOS	46

1. INTRODUÇÃO

Saúde bucal é essencial para o bem-estar e qualidade de vida, está intimamente ligada a saúde geral, pois sua deficiência pode estar relacionada a condições crônicas e problemas sistêmicos, gerar dor e sofrimento, além de afetar a comunicação, alimentação, qualidade de vida e bem-estar¹. Isso implica muito mais do que saúde dental e periodontal, inclui problemas orofaciais, de garganta, distúrbios congênitos e até morbidade. Doenças bucais, como cárie dentária e periodontites, são consideradas como problema de saúde pública devido alta prevalência, ao impacto pessoal e social sobre indivíduos e ao custo do tratamento².

A cárie dentária continua a ser uma doença com alta prevalência e alto custo de tratamento em todo mundo^{2,3}. É uma doença de etiologia multifatorial, biofilme-açúcar-dependente⁴, e as lesões de cárie dentária representam a consequência de uma doença que se instalou subclínicamente há meses ou anos⁵. A doença se caracteriza pela progressiva perda de mineral dos dentes decorrente das constantes queda de pH induzidas pelo metabolismo bacteriano, quando o biofilme é constantemente exposto a carboidratos fermentáveis⁶.

O biofilme dental é o fator necessário para desenvolvimento da cárie dentária e se caracteriza por uma comunidade microbiana incluída em uma matriz de material extracelular e aderida a superfície dental^{7,8}. A organização bacteriana em biofilme garante proteção aos micro-organismos do biofilme, o que gera uma resistência aumentada às agressões ambientais, além de facilitar interação tanto entre as células bacterianas como com o hospedeiro⁹.

Entre as bactérias do biofilme dental, *Streptococcus mutans* tem papel de destaque por atuar com eficiência na instalação e progressão da doença devido seus fatores de virulência: capacidade de sintetizar polissacarídeos extracelulares (PEC), propriedades acidogênicas e acidúricas¹⁰. Já a sacarose é considerada o carboidrato da dieta mais cariogênico, pois é fermentável e funciona como substrato para produção de polissacarídeos extracelulares no biofilme^{8,11}.

PEC produzidos pelos *Streptococcus mutans* correspondem ao principal fator de virulência desse micro-organismo e constituintes da matriz do biofilme cariogênico. A matriz de PEC garante estrutura tridimensional de desenvolvimento do biofilme, promove adesão à superfície e coesão entre os micro-organismos, tornando-o mais espesso e pegajoso, bem como dificulta a difusão de compostos antimicrobianos¹².

O uso de fluoretos, controle mecânico do biofilme e cuidados profissionais são práticas consagradas para prevenção da cárie¹³. Entre essas estratégias, a escovação dentária é um método consagrado, pois se trata de um hábito aceito pela sociedade, capaz promover controle do biofilme, remover odores e tornar os dentes mais atraentes. Quando realizada de forma adequada, a escovação dentária é capaz de remover biofilme suficiente para evitar desenvolvimento da cárie dentária. Entretanto, a maioria das pessoas não conseguem uma remoção eficiente¹⁴, seja por falta de habilidade adequada ou motivação¹⁵.

Problemas como técnica adequada, duração e frequência da escovação, além da capacidade limitada da escova de higienizar todas as superfícies dentais são fatores que interferem na eficácia do controle mecânico, podendo ser minimizadas pelo controle químico, que funcionam nestes casos como adjuvante ao controle mecânico¹⁶.

Para controle químico, se faz necessário o uso de um agente antibiofilme adequado, que deve possuir as seguintes características: substantividade, biocompatibilidade, diminuição do biofilme, não gerar cepas resistentes, não causar manchamento na superfície dental, não promover disgeusia. Contudo, o mercado não dispõe de nenhum antimicrobiano capaz de preencher todos esses requisitos^{17,18}.

A clorexidina é considerada o padrão ouro antimicrobiano, sendo eficaz tanto contra micro-organismos aeróbios quanto anaeróbios, com capacidade de promover ruptura da membrana bacteriana, o que inibe o crescimento bacteriano e gera morte celular. Por sua característica catiônica, possui alta substantividade e retentividade¹⁶. Entretanto, apesar de inúmeras vantagens, existem efeitos adversos associados ao uso prolongado, como coloração

extrínseca a estrutura dental, disgeusia, mucosite oral, atresia das glândulas salivares^{16,19,20} e desenvolvimento de bactérias resistentes^{15,20}.

Apesar da disponibilidade comercial de diferentes agentes químicos e das suas vantagens já comprovadas, se faz necessário a implementação de estratégias preventivas com menores efeitos adversos, que sejam socialmente aceitáveis, de fácil disponibilidade e baixo custo. Os extratos naturais de origem vegetal aparecem como alternativa por serem fonte de compostos biologicamente ativos, passíveis de servirem como base para o desenvolvimento de novos produtos químicos^{15,21}, além de exibirem diversos modos de ação na superfície bacteriana, a depender da sua composição fitoquímica²².

O Brasil possui características que favorecem o desenvolvimento da fitoterapia, tais como: grande diversidade vegetal, sociodiversidade, uso de produtos naturais associadas ao conhecimento popular e tecnologia capaz de promover a validação científica²³. Entretanto, os produtos naturais são utilizados apenas como alternativa ao custo elevado dos fármacos sintéticos e não como primeira e única opção de tratamento^{24,25}. A popularidade dos produtos naturais de origem vegetal é atribuída a razões históricas e culturais, são utilizados tanto com caráter terapêutico, como também para manutenção da saúde oral^{20,26}.

Pesquisa recente desenvolvida pelo Grupo de Fármaco-química de drogas naturais da Universidade Federal do Maranhão, avaliou a atividade antimicrobiana e antiaderente *in vitro* de espécies vegetais da flora local sobre *Streptococcus mutans*, indicando que os extratos *Psidium guajava* Linn, *Schinus terebinthifolius* Raddi e *Anacardium occidentale* Linn possuem atividade antimicrobiana e antiaderente contra *Streptococcus mutans*²⁷. Outros estudos do mesmo grupo, também confirmaram que *Psidium guajava* L.²⁶ e *Anacardium occidentale* L.²⁸ possuem atividade antimicrobiana contra *Streptococcus mutans*. Os resultados destes trabalhos, serviram de base para escolha das espécies que seriam utilizadas para o estudo em biofilme.

Anacardium occidentale da família Anacardiaceae é uma planta nativa do Brasil e encontrada nas regiões costeiras do norte e nordeste em larga

ocorrência²⁹, popularmente conhecida como cajueiro e muito utilizada pela população^{26,30}. Possui valor econômico e medicinal e empiricamente utilizada para atividades antibacteriana, antifúngica, antioxidante, anticancerígeno e anti-inflamatória^{20,29,31}. Em relação ao uso na cavidade bucal, há relatos da população para dor de dente e sangramento gengival²⁰, estomatite, aftas, inflamações bucais, ulcerações por prótese^{26,30}, cicatrização pós-exodontia, sangramento gengival, erupção dentária e halitose²⁶. Estudos tem demonstrado efeito contra micro-organismos da cavidade bucal em estado planctônico, tais como *Streptococcus mutans*, *Streptococcus mitis*, *Streptococcus sanguis*, *Streptococcus sobrinus*, *Lacto-bacillus acidophilus*, *Candida albicans*, *Candida tropicalis*, *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus faecalis*, *Streptococcus pyogenes*^{17,28,32}, mas não foi testado em condições que mimetizam a cavidade bucal.

Psidium guajava da família Myrtaceae é uma planta nativa do México, mas também cultivada na América do Sul. Desenvolve-se em clima tropical e subtropical, com preferência por clima seco³³. Utilizada principalmente para finalidades antidiarréica, vômito e para diversos problemas gastrointestinais^{33,34,35}. Há outro relato de uso como anti-inflamatório, antimicrobiano, diabetes, problemas de pele, hipertensão, cárie, cicatrizante, alívio da dor e redução da febre³³. Conhecida como goaibeira, *Psidium guajava* é utilizada pela população na cavidade bucal para tratamento de aftas²⁶ e tem revelado atividade antimicrobiana e antifúngica contra micro-organismos da cavidade bucal, como *Streptococcus mutans*, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Candida albicans*, *Streptococcus sanguis*, *Streptococcus salivarius* também em estado planctônico^{26,35,36,37}.

Estudos em biofilme são necessário, devido a dificuldade de analisar o desenvolvimento das propriedades cariogênicas *in vivo*. Porém, em grande parte dos modelos propostos na literatura, o biofilme se desenvolve em exposição permanente aos carboidratos, gerando estresse ácido constante, não simulando condições de alternância entre presença e ausência de carboidratos, mudanças de pH e não utilizam substrato dental. O modelo de biofilme de *Streptococcus mutans* validado por Ccahuana-Vásquez e Cury em

2010, apresenta maior possibilidade de mimetizar as reais condições bucais e possibilita avaliação das substâncias antimicrobianas.

Assim, considerando que há poucos estudos com relatos da atividade antimicrobiana dos extratos de *Anacardium occidentale* e *Psidium guajava* em bactérias cariogênicas e reconhecendo que a organização bacteriana em biofilme é fator necessário para doença cárie, o objetivo desse trabalho foi avaliar *in vitro* a capacidade dos extratos da casca de *Anacardium occidentale* e extrato da folha de *Psidium guajava* de interferir nas propriedades cariogênicas do biofilme e desmineralização do esmalte dentário com o uso de modelo de biofilme *Streptococcus mutans*.

2. CAPÍTULO 1

Potencial anticariogênico de *Anacardium occidentale* Linn e *Psidium guajava* Linn em biofilme de *Streptococcus mutans*

(Artigo a ser submetido a Revista Brazilian Oral Research)

RESUMO

Este estudo avaliou *in vitro* a capacidade dos extratos hidroalcoólicos de *Anacardium occidentale* L. e *Psidium guajava* L. de interferir no biofilme de *Streptococcus mutans* e desmineralização do esmalte dentário. Os extratos foram obtidos por maceração em etanol à 70%, secos e ressuspensos em água destilada. Foi determinada a Concentração Bactericida Mínima (CBM). Os biofilmes foram formados sobre blocos de esmalte bovinos e expostos 8 vezes/dia por 1 minuto à sacarose à 10%. Após 48 horas, receberam 2 vezes/dia os seguintes tratamentos: G1, extrato da casca de *Anacardium occidentale* 200 mg/mL; G2, extrato da folha de *Psidium guajava* 200 mg/mL; G3, NaCl 0,9%; G4, Clorexidina (CHX) 0,12%; G5, NaF 0,05%. Após três dias de tratamento os biofilmes foram coletados para quantificação de viabilidade bacteriana, biomassa e polissacarídeos. A desmineralização foi estimada por microdureza (%PDS). A CBM para os extratos foi de 50 mg/mL. Em relação ao pH, *Psidium guajava* diferiu do NaCl após as 96 e 120 horas ($p < 0,05$). Para viabilidade bacteriana, *Psidium guajava* apresentou médias menores do que o NaCl ($p < 0,05$), o que não ocorreu com *Anacardium occidentale* ($p > 0,05$). Na análise de perda mineral, *Anacardium occidentale* respondeu semelhante a CHX e ao NaF ($p < 0,05$). Para os polissacarídeos extracelulares insolúveis, ambos os extratos diferiram do NaCl ($p < 0,05$), mas não entre si. Dessa forma, os extratos de *Anacardium occidentale* e *Psidium guajava*, são capazes de interferir na dinâmica do biofilme cariogênico.

Palavras-chaves: Cárie dentária. Biofilmes. *Streptococcus mutans*. Fitoterapia.

ABSTRACT

This study aimed to evaluate *in vitro* the ability of hydroalcoholic extracts of *Anacardium occidentale* L. and *Psidium guajava* L. from interfering in *Streptococcus mutans* biofilm and demineralization of tooth enamel. Extracts were obtained by maceration in 70% ethanol, dried and resuspended in distilled water. The Minimum Bactericidal Concentration (MBC) was determined. The biofilms were then formed on bovine enamel blocks and exposed to sucrose solution at 10% 8 times/day for 1 minute. After 48 hours of growth, the biofilm was treated 2 times/day with the following treatments: G1, *Anacardium occidentale* bark extract 200 mg/ml; G2, *Psidium guajava* leaf extract 200 mg/mL; G3, 0.9% NaCl; G4, chlorhexidine (CHX) 0.12%; G5, 0.05% NaF. After three days of treatment, the biofilms were collected for quantification of bacterial viability, biomass and concentration of extra and intracellular polysaccharides. Demineralization was determined by microhardness (%PDL). MBC found in the extracts was 50mg/ml. For pH, CHX showed higher values and *Psidium guajava* differed from NaCl after 96 and 120 hours ($p < 0,05$). For bacterial viability, CHX showed better means ($p < 0,05$) and *Psidium guajava* showed lower means than NaCl ($p < 0,05$). For mineral loss analyses, *Anacardium occidentale* had a response similar to CHX and NaF ($p < 0,05$). For insoluble extracellular polysaccharides, CHX differed from all groups ($p < 0,05$) and both extracts differed from NaCl ($p < 0,05$). Therefore, *Anacardium occidentale* and *Psidium guajava* extracts are able to interfere in cariogenic biofilm dynamics.

Key words: Dental caries. Biofilms. *Streptococcus mutans*. Phytotherapy.

INTRODUÇÃO

A cárie dentária continua a ser um problema de saúde pública na maioria dos países industrializados, afeta 90% das crianças em idade escolar e a maioria dos adultos. Entretanto, a distribuição e severidade da doença varia entre as diferentes partes do mundo e até dentro dos países. A doença atinge

níveis elevados na América e a razão para este panorama está no aumento do consumo de açúcar e inadequada exposição aos fluoretos¹.

A cárie dentária é uma doença de etiologia multifatorial, biofilme-açúcar-dependente². O biofilme dental representa uma comunidade microbiana incluída em uma matriz de material extracelular e aderida a superfície dental^{3,4}. *Streptococcus mutans* é o principal micro-organismo envolvido na doença cárie devido seus fatores de virulência: capacidade de sintetizar polissacarídeos extracelulares (PEC), propriedades acidogênicas e acidúricas⁵. E a sacarose é considerada o carboidrato mais cariogênico da dieta, pois é fermentável e funciona como substrato para produção de polissacarídeos extracelulares no biofilme^{4,6}.

A produção de polissacarídeos é o principal fator de virulência do *Streptococcus mutans*^{4,6}, sua produção ocorre em condições onde há o aumento do consumo de carboidratos, gerando uma queda do pH no biofilme que é responsável pela desmineralização do esmalte dental. Dependendo da frequência com que esse processo ocorre, há formação e desenvolvimento da doença cárie⁵.

Para prevenção da cárie, é preconizado o uso de fluoretos, controle mecânico do biofilme e cuidados profissionais como métodos consagradas⁷. A escovação dentária aparece como hábito social, que se bem realizado, promove remoção de biofilme suficiente para evitar a doença⁸. Contudo, a maioria das pessoas não consegue alcançar essa remoção adequada, seja por falta de habilidade ou motivação⁹, por isso, tem sido sugerida a utilização coadjuvante do controle químico⁸. Nesse contexto, a clorexidina aparece como o antimicrobiano padrão, entretanto seu uso apresenta algumas restrições devido aos seus efeitos colaterais^{8,9,10}.

Na busca de estratégias preventivas com menores efeitos adversos, socialmente aceitáveis, de fácil disponibilidade e baixo custo, surgem os produtos naturais como fonte de compostos biologicamente ativos, passíveis de servirem como base para o desenvolvimento de novos produtos químicos⁹. Entre os produtos naturais já analisados pelo Grupo de Fármaco-química de drogas naturais da Universidade Federal do Maranhão, destacam-se

*Anacardium occidentale*¹¹ e *Psidium guajava*¹², os quais foram analisados em trabalhos anteriores do laboratório e revelaram possuir atividade antimicrobiana contra *Streptococcus mutans*.

Anacardium occidentale L. (Anacardiaceae), é utilizado pela população para estomatite, aftas, inflamações bucais, ulcerações por prótese^{12,13}, cicatrização pós-exodontia, sangramento gengival, erupção dentária e halitose¹². Estudos tem demonstrado efeito contra micro-organismos da cavidade bucal^{10,11,14}. *Psidium guajava* L. (Myrtaceae), é utilizada na cavidade bucal para tratamento de aftas¹² e tem revelado atividade antimicrobiana e antifúngica contra micro-organismos da cavidade bucal^{12,15}.

Entretanto, a maioria dos estudos com esses extratos, analisaram a bactéria em estado planctônico, o que não corresponde a realidade da cavidade bucal. O modelo de biofilme de *Streptococcus mutans* apresenta maior possibilidade de adquirir as reais condições bucais, possibilitando melhor avaliação da eficácia de substâncias antimicrobianas¹⁶.

Assim, o objetivo desse trabalho foi avaliar *in vitro* a capacidade dos extratos da casca de *Anacardium occidentale* e da folha de *Psidium guajava* de interferir nas propriedades cariogênicas do biofilme e desmineralização do esmalte dentário com o uso de modelo de biofilme *Streptococcus mutans*.

MATERIAIS E MÉTODOS

Este trabalho foi previamente aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal do Maranhão, sob parecer de número 1.378.124/ 2015.

Coleta e identificação botânica

Amostras das folhas de *Psidium guajava* L. e casca de *Anacardium occidentale* L. foram adquiridas por coleta manual com uso de instrumento cortante em área de cultivo natural do estado do Maranhão (Latitude – 3,63076,

Longitude – 44,55, 3 graus 37'51" Sul, 44 graus 33'11" Oeste), realizadas nos meses de junho a dezembro de 2015, segundo as determinações estabelecidas na literatura especializada¹⁷. A identificação botânica foi realizada no Herbário Ático Seabra da Universidade Federal do Maranhão (UFMA); onde a exsicata está depositada sob o número 1182 para *Psidium guajava* L. e número 1050 para *Anacardium occidentale* L.

Obtenção dos extratos

Os materiais vegetais (folhas de *Psidium guajava* e casca de *Anacardium occidentale*) após etapas de identificação botânica e secagem (em estufa de circulação de ar, em temperatura de 38°C), foram submetidos à extração exaustiva por maceração com etanol à 70% por sete dias.

As soluções obtidas foram filtradas e concentradas sob pressão reduzida em rota-evaporador e os resíduos secos diluídos em água destilada. Antes do uso as soluções foram esterilizadas por filtração em membrana de 0,22 µm, em câmara de fluxo laminar e mantidas em frascos estéreis a 4°C. O rendimento dos extratos foi de 13,01% para folhas de *Psidium guajava* e 15,45% para casca de *Anacardium occidentale*. Para os ensaios microbiológicos *in vitro*, 10 gramas de cada extrato foi ressuspenso em 50 mL de água destilada estéril.

Concentração Inibitória Mínima (CIM) e Concentração Bactericida Mínima (CBM)

O inóculo foi ressuspenso em meio de cultura de extrato de tripton e levedura – TYB + glicose 1%. As suspensões de células foram padronizadas em espectrofotômetro em densidade óptica de $1,6 \pm 0,5$ em comprimento de onda de 600nm para obtenção do inóculo bacteriano.

A CIM foi determinada através da técnica de microdiluição em caldo, segundo metodologia proposta pelo National Committee for Clinical Laboratory Standard¹⁸. As concentrações finais dos extratos variaram de 50 a 0,39 mg/mL. Todos os ensaios foram realizados em triplicata.

Após o período de incubação não foi possível a leitura da CIM devido à coloração dos extratos, dessa forma, alíquotas de cada poço foram repicadas em placas contendo Agar BHI (Brain Heart Infusion Agar - DIFCO®). As placas foram incubadas em microaerofilia por 48 horas e, após esse período, a CBM foi determinada. A CBM foi definida como a menor concentração do extrato que inibiu o crescimento bacteriano

Preparo dos blocos de esmalte

Blocos de esmalte hígidos (7x4x1mm) foram obtidos da face vestibular de incisivos bovinos como previamente descrito¹⁶. A superfície externa do bloco foi polida, permitindo a determinação da dureza de superfície, que foi realizada utilizando um microdurômetro (Shimadzu), com endentador Knoop aplicado com carga de 50 gramas por 5 segundos. Três endentações foram realizadas, com espaçamento de 100 µm entre cada uma delas, e a média de dureza foi utilizada. Os blocos foram esterilizados em óxido de etileno, randomizados em cinco grupos e ancorados em ganchos de metal que garantiam posição vertical em placa de 48 poços.

Coleta e processamento da saliva

A saliva foi coletada em tubos de ensaio estéreis mantidos em recipiente com gelo até o processamento da mesma, que consistiu na adição de solução de Phenylmethylsulfonyl Fluoride (PMSF) 1 Milimolar e tampão adsorption, e centrifugação a 10000 rotações por minuto durante 5 minutos a 4°C. O sobrenadante foi filtrado por membrana (0,22 µm) e acondicionado em recipiente estéril. Em seguida, a saliva foi utilizada para a formação de película salivar adquirida nos blocos de esmalte por um tempo de 15 minutos em estufa a 37°C.

Crescimento do biofilme

Após a formação da película, os blocos foram mantidos suspensos verticalmente e individualmente posicionados nos poços contendo 1,0 mL do inóculo com aproximadamente 1×10^8 UFC/mL de *Streptococcus mutans* em

meio de TYB e foram incubadas a 37°C a 10% de CO₂ para a adesão bacteriana sobre a película adquirida. Após 8 horas de incubação, os blocos foram transferidos para novo meio TYB contendo 0,1 Milimolar de glicose (concentração salivar basal) e incubados por mais 16 horas a 37°C a 10% de CO₂. No dia seguinte, os blocos foram transferidos para um meio novo e foram expostos 8 vezes/dia por 1 minutos à sacarose à 10% em tempos pré-determinados (8:00, 9:30, 11:00, 12:30, 14:00, 15:30, 17:00 e 18:30 horas). Após cada exposição à sacarose, os biofilmes foram lavados 3 vezes em solução de NaCl 0,9%¹⁶.

Tratamentos

A partir do terceiro dia até o quinto dia, os biofilmes foram expostos 2 vezes/dia por 1 minuto às seguintes soluções: (G1) Extrato de *Anacardium occidentale* 200 mg/mL; (G2) Extrato de *Psidium guajava* 200 mg/mL; (G3) NaCl 0,9%; (G4) Clorexidina 0,12%; (G5) NaF 0,05%. Após cada exposição às soluções, os biofilmes foram lavados 3 vezes em solução de NaCl 0,9%. Antes da primeira e após a última exposição do dia, o meio foi novamente renovado. Este procedimento foi repetido por três dias. Ao fim de cada dia o pH do meio de cultura foi determinado como um indicador de acidogenicidade do biofilme. Para a avaliação estatística, a média de cada repetição (n=6) foi considerada um bloco experimental¹⁶.

Coleta do biofilme

No final do experimento, os biofilmes foram transferidos para eppendorfs e os biofilmes foram lavados três vezes em 0,9% de NaCl para remover o material frouxamente aderido. Os biofilmes foram diluídos a temperatura ambiente com 1 mL de solução salina estéril, submetendo os blocos a homogeneização por vórtex e com o uso de pérolas de vidro para remover biofilmes formados sobre os blocos. Alíquotas da suspensão foram usadas para determinar a viabilidade bacteriana do biofilme, peso úmido e concentração de polissacarídeos.

Viabilidade bacteriana

Uma alíquota de 100 µL da suspensão foi diluída em solução de NaCl 0,9% estéril em série até 10^{-8} , e **duas gotas de 10 µL** de cada diluição seriada foram inoculadas **em agar BHI (BD, Sparks, USA)**. **As placas foram incubadas por 48 h a 37°C, 10% de CO₂**. **As unidades formadoras de colônias foram contadas e expressas como UFC / mg de peso úmido de biofilme¹⁹**. **O parâmetro de leitura foi considerado de 6 a 10 colônias.**

Determinação da biomassa

Em eppendorfs pré-pesados, uma alíquota de 400 µL da suspensão de biofilme foi adicionada e centrifugada a 10.000 rotações por minuto, por 5 minutos a 4 ° C e o sobrenadante foi descartado. O tubo foi novamente centrifugado e o resto do sobrenadante foi cuidadosamente aspirado a vácuo com uma micropipeta sob um microscópio para remover qualquer resíduo de líquido. A determinação do peso úmido foi realizada pela diferença entre o peso final e o peso inicial do eppendorf.

Análise dos polissacarídeos

Uma alíquota de 400 µL da suspensão do biofilme agitado foi centrifugada a 10.000 rotações por minuto, 4 °C, por 5 minutos. O sobrenadante contendo polissacarídeos solúveis foi transferido para um tubo denominado PECS. O pellet foi lavado com 100 µL de solução salina, centrifugado e o sobrenadante foi também adicionado ao tubo PECS, juntamente com 3 volumes de etanol gelado. Ao pellet foram adicionados 400 µL de NaOH 1Molar para extração dos polissacarídeos extracelulares insolúveis (PECI). Este tubo foi vortexado, agitado por 15 minutos e centrifugado. O sobrenadante foi transferido para um tubo de nome PECI. O pellet foi lavado com 100 µL de NaOH 1Molar, centrifugado e o sobrenadante foi adicionado ao tubo PECI, juntamente com 3 volumes de etanol gelado. Ao tubo centrifugado contendo o pellet residual, 400 µL de NaOH 1Molar foram adicionados para extração do polissacarídeo intracelular (PIC). Este tubo foi vortexado, aquecido a 100° C por 15 minutos, centrifugado e o sobrenadante

foi transferido para outro tubo de nome PIC. O pellet foi lavado e a extração do PIC foi semelhante à extração do PECl. Os tubos contendo etanol gelado mais PECS, PECl e PIC foram mantidos por 30 minutos a -20 °C, centrifugados e o pellet foi lavado duas vezes com etanol 70% gelado. O precipitado de polissacarídeos foi ressuscitado em 250 µL em NaOH 1Molar e os carboidratos totais foram estimados pelo método fenol sulfúrico, utilizando glicose como carboidrato padrão¹⁹. Os resultados foram normalizados por peso úmido de biofilme.

Determinação da desmineralização do esmalte

Ao final do experimento, a dureza de superfície dos blocos de esmalte foi novamente medida através de três endentações adjacentes com uma distância de 100 µm entre elas e a 100 µm de distância das endentações iniciais. Foram calculados os valores médios das três endentações iniciais e das três medições após os tratamentos, e o percentual da mudança da dureza de superfície foi calculado como indicador da desmineralização do esmalte¹⁶.

Análise estatística

A normalidade da distribuição de erro e a homogeneidade de variância foram verificadas utilizando o pacote SAS/ LAB (SAS software, versão 8.01, SAS Institute Inc., Cary, EUA), os dados foram transformados como sugerido pelo software para garantir normalidade (UFC/mg, PECS e PIC os dados foram transformados para Log10 e PECl para raiz quadrada) e o nível de significância foi fixado em 5%. Os dados de UFC/mg, polissacarídeos e perda de desmineralização foram analisados por ANOVA, seguido do teste de Tukey. Já a análise de pH foi feita por ANOVA de medidas repetidas, comparando os tempos do mesmo tratamento e os tratamentos no mesmo tempo.

RESULTADOS

Streptococcus mutans mostrou-se susceptível à ação tanto do extrato da casca de *Anacardium occidentale* quanto ao da folha de *Psidium guajava*. Ambos os extratos revelaram uma CBM de 50 mg/mL.

Os valores de pH após 24 e 48 horas de crescimento do biofilme não diferiram estatisticamente ($p > 0,05$). Após o início dos tratamentos (72, 96 e 120 horas), todos os grupos tiveram valores menores que o da clorexidina ($p < 0,05$) em todos os tempos analisados. Em relação aos extratos, apenas *Psidium guajava* diferiu do controle negativo (NaCl 0,9%) após as 96 horas e 120 horas. NaF 0,9% não diferiu do controle negativo após as 120 horas (Figura 1).

Os valores para viabilidade bacteriana (UFC/mg), perda mineral (%PDS), polissacarídeos extracelulares solúveis (PECS), insolúveis (PECI) e intracelulares (PIC) estão expressos na Tabela 1.

Para viabilidade bacteriana, os valores de UFC/mg do grupo tratado com extrato da folha de *Psidium guajava* apresentou média estatisticamente menor que o controle negativo ($p < 0,05$). O extrato da casca de *Anacardium occidentale* não apresentou diferença significativa do extrato de *Psidium guajava* e também do controle negativo ($p > 0,05$). O controle positivo antimicrobiano (CHX) apresentou menores valores de UFC/mg em relação a todos os grupos ($p < 0,05$) e NaF 0,05 % não diferiu do controle negativo ($p > 0,05$).

O extrato de *Anacardium occidentale* foi capaz de reduzir a %PDS semelhante a clorexidina e o NaF ($p > 0,05$), diferindo estatisticamente do controle negativo, o que não ocorreu com o extrato de *Psidium guajava* ($p > 0,05$).

Em relação aos polissacarídeos extracelulares solúveis, todos os tratamentos apresentaram-se semelhantes ($p > 0,05$). Já os polissacarídeos intracelulares, a clorexidina foi capaz de diferir dos demais grupos ($p < 0,05$). Para os polissacarídeos extracelulares insolúveis, os dados da Tabela 1 mostram que os extratos de *Anacardium occidentale* e *Psidium guajava* diferiram do controle negativo ($p < 0,05$), mas não entre si ($p > 0,05$). NaF 0,05 % e NaCl 0,9 % não diferiram entre si ($p > 0,05$) e a CHX diferiu de todos os grupos ($p < 0,05$).

DISCUSSÃO

Neste estudo, o extrato da casca de *Anacardium occidentale* e extrato da folha de *Psidium guajava* demonstraram interferir na dinâmica do biofilme dental e no processo de formação da cárie dental. O extrato de *Psidium guajava* demonstrou ação na viabilidade bacteriana (UFC/mg), produção de PEGI e interferiu no pH do meio e o extrato de *Anacardium occidentale* interferiu claramente na produção PEGI e perda mineral (%PDS).

Para o extrato de *Anacardium occidentale*, a literatura revela valores de CBM inferiores aos encontrados aqui. Melo et al 2006, avaliando o efeito do extrato frente *Streptococcus mutans*, relatou CBM de 12,5 mg/mL. Já resultados do laboratório, indicaram CBM de 5 mg/mL, contra *Streptococcus mutans*. Para o extrato de *Psidium guajava* estudos revelam valores tanto superiores: 187,5 mg/mL²¹; quanto inferiores: 12,5 mg/mL¹². Essas diferenças podem ser explicadas devido a fatores ambientais que permitem variação na composição química de uma mesma espécie vegetal, tais como: sazonalidade, temperatura, índice pluviométrico, nutrientes e altitude²².

Por outro lado, quando organizadas na forma de biofilme, as bactérias exibem resistência aumentada aos antimicrobianos e não há consenso nem metodologias padronizadas de como se determinar a CBM em biofilmes³. Dessa forma, optamos por utilizar uma concentração quatro vezes maior (200 mg/mL), assim como Silva (2012).

O extrato de *Psidium guajava* demonstrou possuir ação antimicrobiana, pois foi capaz de diminuir o número de UFC/mg, com médias menores que o controle negativo. A atividade antimicrobiana pode ser justificada pela presença de hidratos de carbono, flavonoides, esteroides e taninos, compostos isolados em análise fitoquímica da espécie vegetal²³.

Flavonoides isolados de folhas de *Psidium guajava* estão envolvidos na atividade bacteriostática contra *Streptococcus mutans*, sendo esse tipo de ação importante, pois garante manutenção da flora local e não envolve resposta imune²⁴.

A inibição da produção dos PECl pelo extrato da folha de *Psidium guajava* foi um fato bastante interessante, pois PECl são capazes de modular a ação adesiva do biofilme a superfície dentária, promovendo maior força coesiva dentro do biofilme, tornando-o mais espesso, poroso e, assim, mais cariogênico^{4,6}. O extrato da folha de *Psidium guajava* é capaz de alterar característica da superfície bacteriana, o que sugere menor aderência bacteriana a superfícies tratadas com esse extrato²⁵.

Flavonoides presentes em extratos de *Psidium guajava*, foram capazes de reduzir a ação das enzimas glicosiltransferases que catalisam glucanos a

partir da sacarose e que participam da formação da matriz de polissacarídeos e aderência bacteriana²⁶. Tem sido ainda relatada a capacidade desses compostos de diminuir a hidrofobicidade de *Streptococcus mutans*, um dos fatores necessários para aderência da bactéria a superfície²⁴.

A ação pela qual o extrato de *Psidium guajava* interferiu no pH após as 96h e 120 horas (Figura 1), pode estar associada a diminuição de bactérias viáveis no biofilme (Tabela 1) ou por ser capaz de alterar o metabolismo bacteriano, interferindo na cadeia da fermentação e na produção de ácidos, mas isto tem sido pouco estudado. Flavonoides, principalmente quercetina, demonstraram possuir capacidade de diminuir gradualmente a produção de ácidos²⁴. Em termos de cárie, esta capacidade torna-se importante, pois o baixo pH predispõe a proliferação de micro-organismos ácido tolerantes, que são mais virulentos. O controle da cárie por esta via não altera a microbiota bucal e sim, diminui a atividade de micro-organismos acidogênicos²⁷.

A literatura não dispõe até o momento de outros estudos com extratos de *Psidium guajava* para o controle de biofilme dental. Talvez isso seja devido a principal indicação popular ser para distúrbios gastrointestinais²⁸. Entretanto, o presente trabalho analisou esse extrato devido a estudos prévios relatarem atividade antibacteriana contra *Streptococcus mutans* na forma planctônica com resultados significativos^{12,29}.

Em relação ao extrato da casca de *Anacardium occidentale* sua ação mais evidente foi na inibição tanto da produção dos PECl quanto na perda mineral (%PDS). Sendo que, em termos de perda mineral, sua ação foi semelhante a clorexidina 0,12% e ao NaF 0,05%, o que é um dado bastante interessante já que ambos são considerados padrões ouro, clorexidina antimicrobiano e NaF anticárie. *Anacardium occidentale* parece responder semelhante aos dois.

A razão para inibição de PECl poderia ser explicada pela composição fitoquímica. O extrato etanólico da casca de *Anacardium occidentale* é rico em compostos fenólicos³⁰ e o mecanismo de ação destes compostos não é totalmente compreendido, porém, tem sido sugerido que estes compostos são

capazes de interferir na enzima glicosiltransferase, prejudicando a adesão bacteriana a superfície dentária¹⁴.

O extrato de *Anacardium occidentale* testado no presente trabalho demonstrou atividade antibacteriana limitada em biofilme dental, pois não foi capaz de diminuir as UFC/mg de *Streptococcus mutans* de maneira significativa. Tal achado difere da literatura que apresenta até o momento apenas dois estudos publicados da ação do extrato de *Anacardium occidentale* na dinâmica do biofilme dental. Em ambos os estudos, os extratos pesquisados parecem diminuir a viabilidade bacteriana, tanto para o trabalho que avaliou extrato das folhas, com tempo de tratamento de 24 horas¹⁰, quanto para o que avaliou extrato dos pedúnculos, com tratamento de 4 horas³¹. Trabalho de Silva (2012) revelou ainda a ação de extrato das flores sobre biofilme, que foi tratado nos tempos de 30, 60, 120 e 180 minutos. Reduções significativas foram observadas após os 30 minutos.

Os resultados diferentes podem ser justificados pelo tempo de tratamento, pelo espécime utilizado para fazer o extrato, pelas diferentes cepas utilizadas e pelo período de coleta. Este trabalho simula o tratamento com um colutório, em um tempo bastante inferior, de apenas 1 minuto. Esse tempo reduzido apresenta uma vantagem, pois há a possibilidade de que o uso por tempo prolongado possa gerar efeitos adversos, como ocorre com a clorexidina. Vale ressaltar que esses estudos fizeram análise apenas de viabilidade bacteriana, enquanto o presente estudo agregou ainda polissacarídeos, pH e dureza.

Não parece claro o mecanismo pelo qual o extrato de *Anacardium occidentale* inibiu a perda mineral tão marcadamente, uma vez que este não diminuiu a contagem de *Streptococcus mutans*, não interferiu no pH do meio e mostrou efeito semelhante ao *Psidium guajava* quanto à capacidade de inibir a formação de PEI (embora tenha apresentado menores valores médios).

Nesse contexto, foi avaliada a concentração de flúor no extrato da casca de *Anacardium occidentale*, entretanto, esta análise mostrou valores muito baixos de F (0,0625 ppm para *Anacardium occidentale* e 0,125 ppm para *Psidium guajava*, dados não mostrados), o que não justifica os achados em

relação a perda mineral. Em termos de cárie dental, a literatura tem o íon flúor como padrão ouro, pois é capaz de interferir por meio de mecanismo físico-químico na perda mineral (através da precipitação de fluorapatita sobre os dentes), sem interferir no acúmulo de biofilme e produção de ácidos⁷. Estudos adicionais da composição química do extrato de *Anacardium occidentale* devem ser feitos para esclarecer o mecanismo pelo qual este interfere na inibição da perda de minerais do dente.

O modelo de biofilme utilizado permitiu maior mimetização do processo que ocorre na cavidade bucal. Outros modelos de biofilme propostos possuem algumas limitações, tais como: exposição constante a carboidratos, o que gera estresse ácido constante e não simula períodos de alternância entre presença e ausência de carboidratos, além de não utilizarem substrato dental para análise do processo de desmineralização dentária¹⁶.

Neste estudo, foi utilizado um modelo de biofilme monoespécie, representado pelo *Streptococcus mutans*, como a bactéria mais cariogênica do biofilme dental. Contudo, novos estudos devem ser conduzidos em modelos de biofilme multi-espécies, já que relações de antagonismo e sinergismo podem ocorrer alterando a dinâmica do biofilme. Além disso, são necessários estudos futuros relacionados ao fracionamento dos extratos, para melhor compreender mecanismos de ação bem como análises de citotoxicidade.

Para estudos clínicos, deve-se ter por base a concentração utilizada no biofilme, com emprego de metodologias de aplicação clínica que possibilitem a viabilidade de uso na prática diária. As espécies vegetais utilizadas neste trabalho são de ocorrência abundante e revelam possuir baixa citotoxicidade. Extrato de *Psidium guajava* não possuem atividade citotóxica contra neutrófilos³², assim como extrato de *Anacardium occidentale* que também não revelou toxicidade em animais³³.

A partir dos achados do presente estudo, sugere-se que o extrato da folha de *Psidium guajava* possui as características de um bom agente antimicrobiano, pois possui a capacidade de diminuir a quantidade de bactérias, interferir na produção de ácidos, assim como interferir na adesão bacteriana. Assim como o extrato de *Anacardium occidentale* possui

características de um agente anticárie, pois interferiu na adesão bacteriana e diminuiu a desmineralização dentária. Diante do exposto, ambos os extratos são capazes de interferir nas propriedades cariogênicas do biofilme, um dos fatores necessários para desenvolvimento da cárie dentária.

REFERÊNCIAS

- ¹ Petersen PE (2003) The World Oral Health Report 2003: Continuous improvement of oral health in the 21st century: the approach of the WHO Global Oral Health Programme. *Community Dentistry and Oral Epidemiology* 31 (Suppl 1): 3-24.
- ² Ribeiro CCC, Ccahuana-Vásquez RA, Carmo CDS, Alves CMC, Leitão TJ, Vidotti LR, Cury JA. The effect of iron on *Streptococcus mutans* biofilm and on enamel demineralization. *Braz Oral Res.* 2012; 26(4): 300-5
- ³ Marsh PD. Dental Plaque as a Microbial Biofilm. *Caries Res.* 2004; 38: 204–11.
- ⁴ Bowen WH, Koo H. Biology of *Streptococcus mutans*- derived glucosyltransferases: role in extracellular matrix formation of cariogenic biofilms. *Caries Res.* 2011; 45:69–86.
- ⁵ Takahashi N, Nyvad B. Caries ecology revisited: microbial dynamics and the caries process. *Caries Res.* 2008; 42: 409-18.
- ⁶ Paes Leme F, Koo H, Bellato CM, Bedi G, Cury JA. The role of sucrose in cariogenic dental biofilm formation- New insight. *J Dent Res.* 2006; 85(10): 878-87.

⁷ Tenuta LMA, Cury JA. Fluoride: its role in dentistry. *Braz Oral Res.* 2010; 24 (Spec Iss 1): 9-17.

⁸ Rugg-Gunn A. Dental caries: Strategies to control this preventable disease. *Acta Med Acad.* 2013; 42(2): 117-30

⁹ Chandra Shekar BR, Nagarajappa R, Suma S, Thakur R. Herbal extracts in oral health care - a review of the current scenario and its future needs. *Pharmacogn Rev.* 2015; 9(18): 87-92.

1.1.1.1.1 ¹⁰ Anand G, Ravinanthan M, Basaviah R, Shetty AV. *In vitro* antimicrobial and cytotoxic effects of *Anacardium occidentale* and *Mangifera indica* in oral care. *J Pharm Bioall Sci.* 2015; 7(1): 69-74.

¹¹ Silva, RA. Ação antimicrobiana de *Anacardium occidentale* L.: potencial biotecnológico na geração de produtos anticárie. 2012. [Tese]- Fortaleza (CE): Universidade Estadual do Ceará, 2012.

¹² Vieira DRP, Amaral FMM, Maciel MCG, Nascimento FRF, Libério SA, Rodrigues VP. Plant species used in dental diseases: Ethnopharmacology aspects and antimicrobial activity evaluation. *J Ethnopharmacol.* 2014; 155(3): 1441–49.

¹³ Araújo CRF, Pereira JV, Pereira MSV, Alves PM, Higino JS, Martins AB. Concentração mínima bactericida do extrato do cajueiro sobre bactérias do biofilme dental. *Pesq Bras Odontoped Clin Integr.* 2009; 9(2): 187-91

¹⁴ Carvalho FG, Negrini TC, Sacramento LVS, Hebling J, Spolidorio DMP, Cristiane Duque C. The *in vitro* antimicrobial activity of natural infant fluoride-free toothpastes on oral micro-organisms. *J Dent Child.* 2011; 78(1): 3-8.

¹⁵ Shekar C, Nagarajappa R, Singh R, Thakur R. Antimicrobial efficacy of *Acacia nilotica*, *Murraya koenigii* L. Sprengel, *Eucalyptus hybrid*, and *Psidium guajava* on primary plaque colonizers: na *in vitro* comparision between hot and cold extraction process. *J Indian Soc Periodontol.* 2015; 19(2): 174-79.

- ¹⁶ Ccahuana-Vásquez RA, Cury JA. *S mutans* biofilm model to evaluate antimicrobial substance and enamel demineralization. *Braz Oral Res.* 2010; 24(2): 135-41.
- ¹⁷ Botsaris S. **Fitoterapia Chinesa e Plantas Brasileiras.** Ícone, 2007. 550p.
- ¹⁸ Performance standards for antimicrobial susceptibility testing; seventeenth informational supplement. CLSI document M100-S17. Wayne, Pennsylvania 19087-98 USA.
- ¹⁹ Aires CP, Del Bel Cury AA, Tenuta LM, Klein MI, Koo H, Duarte S, et al. Effect of sucrose and starch on dental biofilm formation and on dentine demineralization. *Caries Res.* 2008; 42(5): 380-6.
- ²⁰ Melo AFM, Santos EJV, Souza LFC, Carvalho AAT, Pereira MSV, Higino JS. Atividade antimicrobiana in vitro do extrato de *Anacardium occidentale* L. sobre espécies de *Streptococcus*. *Revista Brasileira de Farmacognosia.* 2006; 16(2): 202-205.
- ²¹ Pereira CA, Vilela PGF, Oliveira LD, Jorge AOC. Ação antimicrobiana in vitro de extratos glicólicos de *Psidium guajava* L., *Syzygium cumini* L. e *Pimpinella ansium* L. *Rev Int Adolfo Lutz.* 2009; 68(1): 102-8.
- ²² Gobbo-Neto L, Lopes N. Plantas medicinais: fatores de influência no conteúdo de metabólitos secundários. *Química Nova* 30; 2007. 374p.
- ²³ Dhiman A, Nanda A, Ahmad S, Narasimhan B. In vitro antimicrobial activity of methanolic leaf extract of *Psidium guajava* L. *J Pharm Bioallied Sci.* 2011; 3(2): 226-9.
- ²⁴ Prabu GR, Gnanamani A, Sadulla S. Guajaverin – a plant flavonoid as potential antiplaque agent against *Streptococcus mutans*. *J Appl Microbiol.* 2006; 101(2), 487–95.
- ²⁵ Razak FAB, Othman RY, Rahim ZHA. The effect of *Piper betle* and *Psidium guajava* extracts on the cell-surface hydrophobicity of selected early settlers of dental plaque. *J Oral Sci.* 2006; 48(2), 71-5.
- ²⁶ Koo H, Rosalen PL, Cury JA, Park YK, Bowen W. Effects of compounds found in propolis on *Streptococcus mutans* growth and on glucosyltransferase

activity. *Antimicrob Agents Chemother.* 2002; 46(5), 1302–09.

²⁷ Bowen WH. Do we need to be concerned about dental caries in the coming millennium? *Crit Rev Oral Biol Med.* 2002; 13(2): 126-131.

²⁸ Gutiérrez RMP, Mitchell S, Solis RV. *Psidium guajava*: a review of its traditional uses, phytochemistry and pharmacology. *J Ethnopharmacol.* 2008; 117: 1-27.

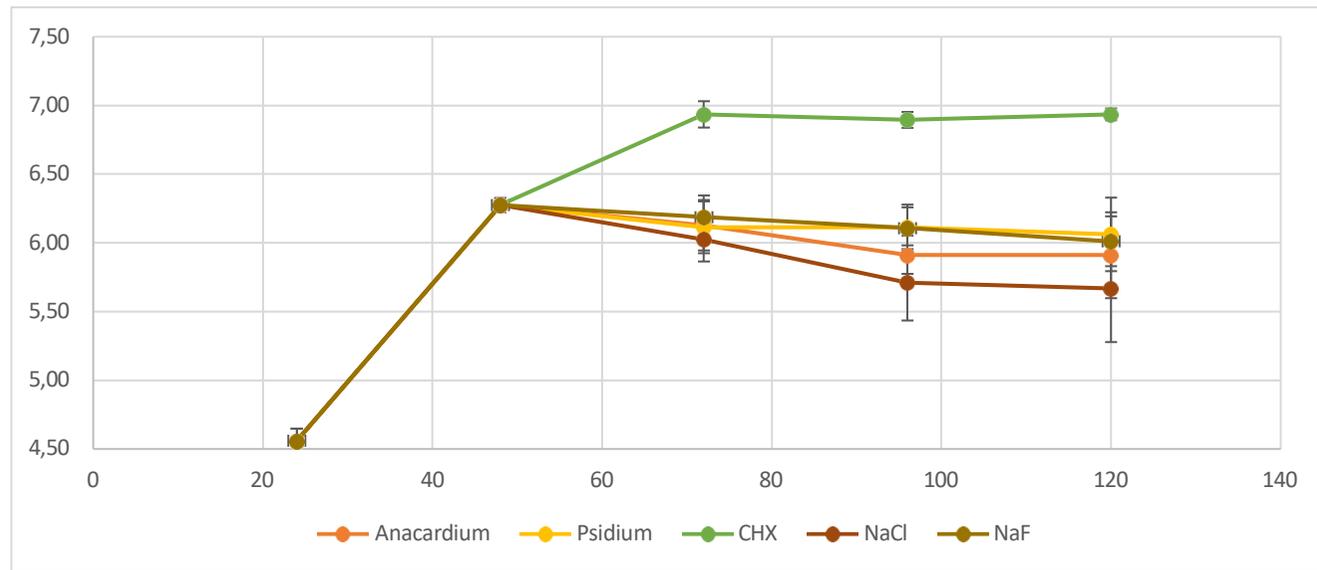
²⁹ Alves PM, Queiroz LMG, Pereira JV, Pereira. Atividade antimicrobiana, antiaderente e antifúngica *in vitro* de plantas medicinais brasileiras sobre microrganismos do biofilme dental e cepas do gênero *Candida*. *Rev Soc Bras Med Trop.* 2009; 42(2): 222-24.

³⁰ Chaves MH, Citó AMGL, Lopes JAD, Costa DA, Oliveira CAA, Costa AF, Brito Júnior FEM. Fenóis totais, atividade antioxidante e constituintes químicos de extratos de *Anacardium occidentale* L., *Anacardiaceae*. *Rev Bras Farmacogn.* 2010; 20(1): 106-12.

³¹ Furtado MAM, Alves FCS, Martins JL, Vasconcelos MA, Vanessa Sabrine Correia Ramos VSC, Sousa GS, Silva ALC, Farias WRL, Teixeira EH, Cavada BS, Santos RP. Effect of cashew (*Anacardium occidentale* L.) peduncle bagasse extract on *Streptococcus mutans* and its biofilm. *R Bras Bioci.* 2014; 12(1): 9-13.

³² Fernandez MRV, Azzolini AECS, Martinez MLL, Souza CRF, Lucisano-Valim YM, Oliveira WP. Assessment of antioxidant activity of spray dried extracts of *Psidium guajava* leaves by DPPH and chemiluminescence inhibition in human neutrophils. *Biomed Res Int.* 2014; 1: 1-10.

³³ Konan NA, Bacchi EM. Antiulcerogenic effect and acute toxicity of a hidroethanolic extract from the cashew (*Anacardium occidentale* L) leaves. *J Ethnofarmacol.* 2007; 112(2): 237-42.



Os dados foram analisados por ANOVA two-way de medidas repetidas, seguido de teste de Tukey, $p < 0,05$.

Figura 1 - Média de valores de pH após 48 horas de crescimento do biofilme, 24 horas antes do tratamento e a cada 24 horas após os tratamentos (72, 96 e 120 horas) ($n = 6$).

Tabela 1 – Variável resposta para viabilidade bacteriana (UFC/mg), perda de desmineralização (% PDS) e polissacarídeos extracelulares solúveis (PECS), extracelulares insolúveis (PECI) e intracelulares (PIC) (média ± dp; n=6).

Tratamento	UFC/mg	% PDS	PECS	PECI	PIC
NaCl 0,9%	4,26E+11 ± 4,30E+11 A	17,88 ± 5,47 A	3,27 ± 2,00 A	11,92 ± 2,21 A	4,52 ± 3,43 A
<i>Psidium guajava</i>	7,22E+09 ± 9,48E+09 B	16,53 ± 2,72 AB	3,10 ± 1,58 A	6,53 ± 2,01 B	4,30 ± 1,66 A
<i>Anacardium occidentale</i>	1,37E+10 ± 1,22E+09 AB	10,67 ± 3,27 B	2,03 ± 1,28 A	4,87 ± 1,23 B	3,08 ± 0,88 A
CHX 0,12%	3,19E+07 ± 5,45E+07 C	11,42 ± 4,82 B	1,68 ± 0,69 A	1,73 ± 1,16 C	1,50 ± 0,92 B
NaF 0,05%	6,40E+10 ± 6,05E+10 A	12,27 ± 3,21 B	4,28 ± 2,14 A	8,22 ± 3,85 AB	6,08 ± 4,45 A

As letras iguais significam que não há diferença estatística, letras diferentes significam que há diferença estatística.

Os dados foram analisados por ANOVA seguido de teste de Tukey, $p < 0,05$. Para UFC/mg, PECS e PIC os dados foram transformados para Log10 e Peci para raiz quadrada

3. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os extratos da casca de *Anacardium occidentale* e da folha de *Psidium guajava* foram capazes de modificar o biofilme dentário, fator necessário para o desenvolvimento da doença cárie. Contudo, existe uma escassez de estudos relacionados as propriedades cariogênicas dos extratos de *Anacardium occidentale* e *Psidium guajava* em biofilme. Esses estudos são de extrema importância e se fazem necessários uma vez que a cárie continua a ser um grave problema de saúde pública e o acúmulo de biofilme é fator necessário para seu desenvolvimento.

As pesquisas com produtos naturais têm demonstrado evidências de que extratos vegetais possuem potencial para o desenvolvimento de agentes que podem ser usados em terapias preventivas de doenças bucais. No caso específico de pesquisas com extrato de *Anacardium occidentale* e *Psidium guajava* isso se torna mais interessante uma vez que são espécies vegetais abundantemente cultivadas e de fácil acesso no Norte e Nordeste do Brasil, onde uma grande faixa da população ainda apresenta alta prevalência da doença cárie.

Apesar dos resultados deste trabalho serem encorajadores para a realização de estudos clínicos, se faz necessário estudos prévios relacionados a citotoxicidade, bioprospecção dos compostos químicos, assim com determinar os benefícios terapêuticos, isoladamente ou em combinação com as terapias convencionais. Outro aspecto importante seria a padronização de metodologias, composição química do extrato e controle de qualidade. Uma mistura dos extratos pode ser o caminho para obtenção de um novo produto com atividade tanto antimicrobiana quanto anticárie.

Os resultados diferentes revelam que o controle do biofilme dental é complexo e deve ser considerado como uma importante etapa para avaliação de produtos com ação antimicrobiana.

REFERÊNCIAS

- ¹ Petersen PE (2003) The World Oral Health Report 2003: Continuous improvement of oral health in the 21st century: the approach of the WHO Global Oral Health Programme. *Community Dentistry and Oral Epidemiology* 31 (Suppl 1): 3-24.
- ² Petersen PE Oral Health. In: Kris Heggenhougen and Stella Quah, editors *International Encyclopedia of Public Health*, Vol 4. San Diego: Academic Press; 2008. p. 677-85.
- ³ BRASIL. Ministério da Saúde. Projeto SB Brasil 2010. Pesquisa Nacional de Saúde Bucal. Resultados Principais. Brasília, 2012
- ⁴ Ribeiro CCC, Ccahuana-Vásquez RA, Carmo CDS, Alves CMC, Leitão TJ, Vidotti LR, Cury JA. The effect of iron on *Streptococcus mutans* biofilm and on enamel demineralization. *Braz Oral Res.* 2012; 26(4): 300-5.
- ⁵ Bowen WH. Do we need to be concerned about dental caries in the coming millennium? *Crit Rev Oral Biol Med.* 2002; 13(2): 126-131.
- ⁶ Fejerskov O. Concepts of dental caries and their consequences for understanding the disease. *Community Dent Oral Epidemiol.* 1997 Feb; 25(1): 5-12.
- ⁷ Marsh PD. Dental Plaque as a Microbial Biofilm. *Caries Res.* 2004; 38: 204–11.
- ⁸ Bowen WH, Koo H. Biology of *Streptococcus mutans*- derived glucosyltransferases: role in extracellular matrix formation of cariogenic biofilms. *Caries Res.* 2011; 45:69–86.
- ⁹ Hobbey L, Harkins C, MacPhee CE, Stanley-Wall1 NR. Giving structure to the biofilm matrix: an overview of individual strategies and emerging common themes. *FEMS Microbiol Rev.* 2015; 39(5): 649–69.
- ¹⁰ Takahashi N, Nyvad B. Caries ecology revisited: microbial dynamics and the caries process. *Caries Res.* 2008; 42: 409-18.
- ¹¹ Paes Leme F, Koo H, Bellato CM, Bedi G, Cury JA. The role of sucrose in cariogenic dental biofilm formation- New insight. *J Dent Res.* 2006; 85(10): 878-87.
- ¹² Koo H, Falsetta ML, Klein MI. The Exopolysaccharide Matrix: A virulence Determinant of cariogenic biofilm. *J Dent Res.* 2013; 92(12):1065-73.

¹³ Tenuta LMA, Cury JA. Fluoride: its role in dentistry. *Braz Oral Res.* 2010; 24 (Spec Iss 1): 9-17.

¹⁴ Rugg-Gunn A. Dental caries: Strategies to control this preventable disease. *Acta Med Acad.* 2013; 42(2): 117-30.

¹⁵ Chandra Shekar BR, Nagarajappa R, Suma S, Thakur R. Herbal extracts in oral health care - A review of the current scenario and its future needs. *Pharmacogn Rev.* 2015; 9(18): 87-92

¹⁶ Yadav SR, Kini VV, Padhye A. Inhibition of tongue coat and dental plaque formation by stabilized chlorine dioxide Vs chlorhexidine mouthrinse: a randomized, triple blinded study. *J Clin Diagn Res.* 2015; 9(9): 69-74.

¹⁷ Melo AFM, Santos EJV, Souza LFC, Carvalho AAT, Pereira MSV, Higino JS. Atividade antimicrobiana in vitro do extrato de *Anacardium occidentale* L. sobre espécies de *Streptococcus*. *Rev Bras Farmacogn.* 2006; 16(2): 202-05.

¹⁸ Rocha EALSS, Carvalho AVOR, Andrade SRA, Trovão DMMB, Costa EMMB. Atividade Antimicrobiana “ In Vitro ” de Extratos Hidroalcoólicos de Plantas Medicinais do Nordeste Brasileiro em Bactérias do Gênero *Streptococcus*. *Pesq Bras Odontoped Clin Integr.* 2013; 13(3): 233-38.

¹⁹ Marrelli M, Amantea M, Tatullo M. A comparative, randomized, controlled study on clinical efficacy and dental staining reduction of mouthwash containing chlorhexidine 0,20% and anti discoloration system (ADS). *Ann Stomatol* 2015; VI (2): 35-42

1.1.1.1.2 ²⁰ Anand G, Ravinanthan M, Basaviah R, Shetty AV. *In vitro* antimicrobial and cytotoxic effects of *Anacardium occidentale* and *Mangifera indica* in oral care. *J Pharm Bioall Sci.* 2015; 7(1): 69-74.

²¹ Palombo EA. Traditional medicinal plant extracts and natural products with activity against oral bacteria: potential application in the prevention and treatment of oral diseases. *J Evid Based Complementary Altern Med.* 2011: 1-15.

²² Chinsembu KC. Plants and other natural products used in the management of oral infections and improvement of oral health. *Acta Trop.* 2016; 154: 6-18.

²³ Albuquerque UP, Hanazaki N. As pesquisas etnodirigidas na descoberta de novos fármacos de interesse médico e farmacêutico: fragilidades e perspectivas. *Rev Bras Farmacogn.* 2006; 16(Supl.): 678-89.

- ²⁴ Santos EB, Dantas GS, Santos HB, Diniz MFFM, Sampaio FC. Estudo etnobotânico de plantas medicinais para problemas bucais no município de João Pessoa, Brasil. *Rev Bras Farmacogn.* 2009; 19(1B): 321-24.
- ²⁵ Bitu VCN, Bitu VCN, Matias EFF, Lima WP, Portelo AC, Coutinho HDM, Menezes IRA. Ethnopharmacological study of plants sold for therapeutic purposes in public markets in Northeast Brazil. *Journal of Ethnopharmacology.* 2015; 172: 265–72.
- ²⁶ Vieira DRP, Amaral FMM, Maciel MCG, Nascimento FRF, Libério SA, Rodrigues VP. Plant species used in dental diseases: Ethnopharmacology aspects and antimicrobial activity evaluation. *J Ethnopharmacol.* 2014; 155(3): 1441–49.
- ²⁷ Silva, AS. Atividade antimicrobiana e antiaderente *in vitro* de produtos naturais contra *Streptococcus mutans*. 2013. [Monografia]- São Luís (MA): Universidade Federal do Maranhão, 2013.
- ²⁸ Silva, RA. Ação antimicrobiana de *Anacardium occidentale* L.: potencial biotecnológico na geração de produtos anticárie. 2012. [Tese]- Fortaleza (CE): Universidade Estadual do Ceará, 2012.
- ²⁹ Chaves MH, Citó AMGL, Lopes JAD, Costa DA, Oliveira CAA, Costa AF, Brito Júnior FEM. Fenóis totais, atividade antioxidante e constituintes químicos de extratos de *Anacardium occidentale* L., *Anacardiaceae*. *Rev Bras Farmacogn.* 2010; 20(1): 106-12.
- ³⁰ Araújo CRF, Pereira JV, Pereira MSV, Alves PM, Higino JS, Martins AB. Concentração mínima bactericida do extrato do cajueiro sobre bactérias do biofilme dental. *Pesq Bras Odontoped Clin Integr.* 2009; 9(2): 187-91.
- ³¹ Furtado MAM, Alves FCS, Martins JL, Vasconcelos MA, Vanessa Sabrina Correia Ramos VSC, Sousa GS, Silva ALC, Farias WRL, Teixeira EH, Cavada BS, Santos RP. Effect of cashew (*Anacardium occidentale* L.) peduncle bagasse extract on *Streptococcus mutans* and its biofilm. *R. bras. Bioci.* 2014; 12(1): 9-13.
- ³² Carvalho FG, Negrini TC, Sacramento LVS, Hebling J, Spolidorio DMP, Cristiane Duque C. The *in vitro* antimicrobial activity of natural infant fluoride-free toothpastes on oral micro-organisms. *J Dent Child.* 2011; 78(1): 3-8.
- ³³ Gutiérrez RMP, Mitchell S, Solis RV. *Psidium guajava*: a review of its traditional uses, phytochemistry and pharmacology. *J Ethnopharmacol.* 2008; 117: 1-27.

- ³⁴ Kidaha ML, Alakonya AE, Nyende AB. Bioactivity determination of methanol and water extracts for roots and leaves of Kenyan *Psidium guajava* L landraces against pathogenic bacteria. Springerplus 2013, 2(670): 1-7.
- ³⁵ Gupta K, Hazarika SN, Saikia D, Namsa ND, Mandaln M. One step green synthesis and anti-microbial and anti-biofilm properties of *Psidium guajava* L. leaf extract-mediated silver nanoparticles. Mater Lett. 2014; 125: 67–70.
- ³⁶ Garode AM, Waghode SM. Antibacterial activity of guava leaves extracts against *S. mutans*. Int J Bioassays, 2014, 3 (10), 3370-72.
- ³⁷ Shekar C, Nagarajappa R, Singh R, Thakur R. Antimicrobial efficacy of *Acacia nilotica*, *Murraya koenigii* L. Sprengel, *Eucalyptus hybrid*, and *Psidium guajava* on primary plaque colonizers: na in vitro comparison between hot and cold extraction process. J Indian Soc Periodontol. 2015; 19(2): 174-79.
- ³⁸ Ccahuana-Vásquez RA, Cury JA. *S mutans* biofilm model to evaluate antimicrobial substance and enamel demineralization. Braz Oral Res. 2010; 24 (2): 135-41.

ANEXO 1

UNIVERSIDADE FEDERAL DO
MARANHÃO UFMA



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: AVALIAÇÃO DO EFEITO DE EXTRATOS VEGETAIS NAS PROPRIEDADES CARIOGÊNICAS DO BIOFILME DE *S. mutans* E DESMINERALIZAÇÃO DO ESMALTE DENTÁRIO

Pesquisador: Silvana Amado Libério Pereira

Área Temática:

Versão: 2

CAAE: 50571915.0.0000.5087

Instituição Proponente:

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 1.378.124

Apresentação do Projeto:

Diversos mecanismos vêm sendo utilizado para controle e prevenção da doença cárie, como escovação dental, uso de dentífrico fluoretado, aplicação tópica do flúor, alteração da dieta e uso de agentes químicos. Para o controle químico, os produtos naturais vêm sendo utilizados como princípio ativo para muitas formulações, entretanto em odontologia, ainda há poucos estudos relacionados a dinâmica do biofilme. Estudos anteriores mostraram que o extrato da casca e folha de *Anacardium occidentale* e extrato da folha de *Psidium guajava* possuem atividade contra *S. mutans* no estado planctônico. No entanto, faz-se necessário, analisar a atividade no biofilme, onde os desafios são maiores. Assim, o objetivo deste estudo é avaliar in vitro a capacidade dos extratos hiroalcólicos de *Anacardium occidentale* e *Psidium guajava* de interferir nas propriedades cariogênicas do biofilme e desmineralização do esmalte dentário com o uso de modelo de biofilme *S. mutans* validado. Os biofilmes serão formados sobre blocos de esmalte bovinos e expostos 8x/dia por 1 min à solução de sacarose à 10%. Após 48 h de crescimento, os blocos serão aleatorizados e tratados 2x ao dia por 1 min com: extrato da casca de *Anacardium occidentale* 10%; extrato da folha de *Anacardium occidentale* 10%; extrato de *Psidium guajava* 10%; NaCl 0,9%; clorexidina 0,12%; NaF 0,05%. Os biofilmes serão coletados para quantificação de viabilidade bacteriana, biomassa e da concentração de

Endereço: Avenida dos Portugueses, 1966 CEB Velho
Bairro: Bloco C, Sala 7, Comitê de Ética **CEP:** 65.080-040
UF: MA **Município:** SAO LUIS
Telefone: (98)3272-8708 **Fax:** (98)3272-8708 **E-mail:** cepufma@ufma.br

Continuação do Parecer: 1.378.124

polissacarídeos extra e intracelulares. A desmineralização do esmalte será estimada por microdureza pela porcentagem de perda de dureza de superfície (%PDS) e pela área integrada da perda de dureza em função da profundidade da lesão de cárie (S). Os resultados serão analisados estatisticamente usando testes apropriados, com nível fixado em 5%.

Objetivo da Pesquisa:

Objetivo Primário:

Avaiar in vitro a capacidade dos extratos da casca e da folha de *Anacardium occidentale* e extrato da folha de *Psidium guajava* de interferir nas propriedades cariogênicas do biofilme e desmineralização do esmalte dentário com o uso de modelo de biofilme S: mutans validado.

Objetivo Secundário:

Investigar a alteração da acidogenicidade biofilme; Verificar modificações nos indicadores bioquímicos da matriz do biofilme: polissacarídeos extracelulares, biomassa e na viabilidade bacteriana; Comparar a capacidade de interferir na desmineralização do esmalte dentário.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Riscos:

Contaminação ambiental por S. mutans devido ao descarte inadequado do material utilizado no experimento, no entanto, as precauções necessárias serão tomadas visando minimizar tal risco: assepsia e antisepsia da área de trabalho e equipamentos utilizados e descarte de material em lixo de material contaminado.

Benefícios:

Pacientes serão submetidos a exame clínico e caso apresente cárie ou outras alterações bucais, serão encaminhados para atendimento na Clínica Integrada da Universidade Federal do Maranhão. Pacientes serão orientados quanto à higienização da cavidade bucal, assim como terão aplicação tópica de flúor, após coleta da saliva. Obtenção de produto manipulado à base de *Anacardium occidentale* e *Psidium guajava* como possível forma para controle e prevenção da cárie.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

A pesquisa tem todos os elementos necessários ao bom desenvolvimento com objetivos e materiais e métodos bem sólidos.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Todos os termos de apresentação obrigatórias foram apresentados e estão de acordo com a resolução 466/12 do CNS.

Endereço: Avenida dos Portugueses, 1966 CEB Velho
Bairro: Bloco C, Sala 7, Comitê de Ética **CEP:** 65.080-040
UF: MA **Município:** SAO LUIS
Telefone: (98)3272-8708 **Fax:** (98)3272-8708 **E-mail:** cepufma@ufma.br

Continuação do Parecer: 1.378.124

Recomendações:

Todas as recomendações foram acatadas e corrigidas pela pesquisadora.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Todas as pendências foram acatadas e corrigidas pela pesquisadora e estão de acordo com a resolução 466/12 do CNS.

Considerações Finais a critério do CEP:

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_PROJETO_496691.pdf	26/11/2015 01:14:42		Aceito
Outros	RESPOSTAPARECERPENDENTE.docx	26/11/2015 01:14:09	Silvana Amado Libério Pereira	Aceito
Outros	PROJETOPENDENTE.docx	26/11/2015 01:13:42	Silvana Amado Libério Pereira	Aceito
Outros	PROJETOPENDENTEPDF.pdf	26/11/2015 01:12:50	Silvana Amado Libério Pereira	Aceito
Outros	local.pdf	22/10/2015 12:39:51	Silvana Amado Libério Pereira	Aceito
Folha de Rosto	rosto.pdf	22/10/2015 12:37:06	Silvana Amado Libério Pereira	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLE.docx	22/10/2015 11:37:47	Silvana Amado Libério Pereira	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	PROJETO.pdf	22/10/2015 11:37:29	Silvana Amado Libério Pereira	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	PROJETO.docx	22/10/2015 11:37:13	Silvana Amado Libério Pereira	Aceito
Folha de Rosto	Folha de rosto Allana.pdf	25/06/2015 16:43:46		Aceito

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

Endereço: Avenida dos Portugueses, 1966 CEB Velho
Bairro: Bloco C, Sala 7, Comitê de Ética **CEP:** 65.080-040
UF: MA **Município:** SAO LUIS
Telefone: (98)3272-8708 **Fax:** (98)3272-8708 **E-mail:** cepufma@ufma.br

ANEXO 2

**Laudo de Esterilização**
Data da Esterilização: 05/08/2015
Hora Início: 19:40 Hora Fim: 03:00 **Ciclo: 811** ÓXIDO ETILENO

Resultado da esterilização e leitura de indicadores químicos e biológicos.

Cliente: HOSPITAL SÃO PAULO

Parâmetros analisados:

Tempo de esterilização: 180 minutos
Temperatura média do ciclo: 51 graus Celcius
Indicador químico: Aprovado
Integrador químico: Aprovado
Conformidade do Processo: Aprovado
Observações:

Agente Esterilizante 90 - ÓXIDO ETILENO
Mistura: OXYFUME 90
Indicador Biológico: Negativo

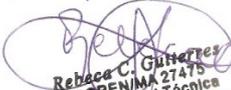
OBS: Cada material foi entregue com os dados em suas respectivas etiquetas.

Responsável Técnico: Enf. REBECA GUTTERRES - COREN - 27475-MA

Cliente	Setor	Itens esterilizados
HOSPITAL SÃO PAULO	CENTRO CIRÚRGICO	11
HOSPITAL SÃO PAULO	U. T. I.	3

Cliente sem cadastro, segue o número do ciclo.

6/08/2015


Rebeca C. Guterres
COREN/MA 27475-MA
Responsável Técnica
Steriliza Corporation

ANEXO 3



INFORMAÇÃO

Informamos aos órgãos de ética e pesquisa em animais que os dentes fornecidos por esta empresa, para testes "in vitro", pertencem a bovinos da raça Nelore, com cerca de 5 anos de idade e 250 kg de peso limpo, tratados dentro de rígidos padrões de qualidade e rastreamento sob fiscalização do Ministério da Agricultura – SIF 1758.

Atenciosamente,


José Mauricio Soares Pardo
Gerente de Vendas
Mondelli Indústria de Alimentos S/A.

ANEXO 4

MISSÃO, ESCOPO E POLÍTICA DE SUBMISSÃO NA BOR

A *Brazilian Oral Research* - BOR (versão online ISSN 1807-3107) é a publicação oficial da Sociedade Brasileira de Pesquisa Odontológica - SBPqO (Divisão brasileira da *International Association for Dental Research* - IADR). A revista tem classificação B1 Qualis Capes Odontologia), Fator de Impacto™ 0,937 (Institute for Scientific Information - ISI), é revisada por pares (sistema duplo-cego) e tem como missão disseminar e promover o intercâmbio de informações sobre as diversas áreas da pesquisa odontológica e com acesso aberto, modalidade dourada, sem embargo.

A **BOR** convida à submissão os seguintes tipos de artigos originais e de revisão, nas seguintes tipologias: Pesquisa Original (artigo completo ou *Short Communication*), Revisão Crítica da Literatura, Revisão Sistemática (e Meta-Análise), além de Cartas ao Editor. Todas as submissões deverão ser exclusivas à **BOR**.

A submissão dos manuscritos, e de toda documentação relacionada, deve ser realizada exclusivamente pelo ScholarOne Manuscripts™, através do link de submissão online (<http://mc04.manuscriptcentral.com/bor-scielo>).

O processo de avaliação do conteúdo científico do manuscrito será iniciado somente após o atendimento dos requisitos descritos nestas Instruções aos Autores. O manuscrito em desacordo com estes requisitos será devolvido ao autor de correspondência para adequações.

Importante: Após ser aceito por seu mérito científico, todo manuscrito deverá ser submetido a uma revisão gramatical e estilística do idioma inglês. Para conhecer as empresas recomendadas, entre em contato com bor@sbspqo.org.br. Os autores deverão encaminhar o texto revisado juntamente com o certificado de revisão fornecido pela empresa de edição escolhida. **Não serão aceitas revisões linguísticas realizadas por empresas que não forneçam o certificado.** Exceção a esta regra é feita quando o autor de correspondência é *native English speaker*.

APRESENTAÇÃO DO MANUSCRITO

O texto do manuscrito deverá estar redigido em inglês e fornecido em arquivo digital compatível com o programa "Microsoft Word" (em formato DOC, DOCX ou RTF).

Cada uma das figuras (inclusive as que compõem esquemas/compos) deverá ser fornecida em arquivo individual e separado, conforme as recomendações descritas em tópico específico.

Fotografias, micrografias e radiografias deverão ser fornecidas em formato TIFF, conforme as recomendações descritas em tópico específico.

Gráficos, desenhos, esquemas e demais ilustrações vetoriais deverão ser fornecidos em formato PDF, em arquivo individual e separado, conforme as recomendações descritas em tópico específico.

Arquivos de vídeo poderão ser submetidos, respeitando as demais especificidades, inclusive o anonimato dos autores (para fins de avaliação) e respeito aos direitos dos pacientes.

Importante: o ScholarOne™ permite que o conjunto dos arquivos somem no máximo 10 MB. No caso de a inclusão do arquivo de vídeo acarretar em tamanho superior, é possível informar o link de acesso ao vídeo. Na reprodução de documentação clínica, o uso de iniciais, nomes e/ou números de registro de pacientes são proibidos. A identificação de pacientes não é permitida. Um termo de consentimento esclarecido, assinado pelo paciente, quanto ao uso de sua imagem deverá ser fornecido pelo(s) autor(es) quando solicitado pela **BOR**. Ao reproduzir no manuscrito algum material previamente publicado (incluindo textos, gráficos, tabelas, figuras ou quaisquer outros materiais), a legislação cabível de Direitos Autorais deverá ser respeitada e a fonte citada.

As seções do manuscrito devem ser apresentadas observando-se as características específicas de cada tipo de manuscrito: folha de rosto (*Title Page*), introdução, metodologia, resultados, discussão, conclusão, agradecimentos e referências.

Folha de rosto (*Title Page*; dados obrigatórios)

- Indicação da especialidade*, ou área de pesquisa, enfocada no manuscrito.

*Anatomia; Biologia Craniofacial; Biologia Pulpar; Bioquímica; Cariologia; Ciências do Comportamento; Cirurgia Bucomaxilo; Controle de Infecção; Dentística; Disfunção Temporomandibular; Estomatologia; Farmacologia; Fisiologia; Imaginologia; Implantodontia - Clínica Cirúrgica; Implantodontia - Clínica Protética; Implantodontia Básica e Biomateriais; Imunologia; Materiais Dentários; Microbiologia; Oclusão; Odontogeriatría; Odontologia Legal; Odontologia Social; Odontopediatria; Ortodontia; Ortopedia; Patologia Oral; Periodontia; Prótese; Saúde Coletiva; Terapia Endodôntica.

- Título informativo e conciso, limitado a um máximo de 110 caracteres incluindo espaços.
- Nomes completos e por extenso de todos os autores, incluindo os respectivos números de telefone e endereços eletrônicos (email). Recomenda-se aos autores confrontar seus nomes anotados na Folha de Rosto (*Title Page*) com o perfil criado no ScholarOne™, de modo a evitar incompatibilidades.
- A participação de cada um dos autores deverá ser justificada por escrito em folha separada, observando-se os critérios de autoria e co-autoria adotados pelo *International Committee of Medical Journal Editors*, disponíveis em <http://www.icmje.org/recommendations/browse/roles-and-responsibilities/defining-the-role-of-authors-and-contributors.html>

- Dados de afiliação institucional/profissional de todos os autores, incluindo universidade (ou outra instituição), faculdade/curso, departamento, cidade, estado e país, apresentados de acordo com as normas internas de citação estabelecidas pela instituição de cada um dos autores. Verificar se as afiliações foram inseridas corretamente no ScholarOne™.

Resumo: deve ser apresentado na forma de um parágrafo único estruturado (mas sem sub-divisões em seções), contendo proposição do trabalho, metodologia, resultados e conclusões. No Sistema, utilizar a ferramenta *Special characters* para caracteres especiais, se aplicável.

Descritores: devem ser fornecidos de 3 (três) a 5 (cinco) descritores principais, escolhidos dentre os descritores cadastrados em <http://decs.bvs.br/> ou <http://www.nlm.nih.gov/mesh/MBrowser.html> (não serão aceitos sinônimos).

Texto Principal

Introdução: deve apresentar o estado da arte do assunto pesquisado, a relevância do estudo e sua relação com outros trabalhos publicados na mesma linha de pesquisa ou área, identificando suas limitações e possíveis vieses. O objetivo do estudo deve ser apresentado concisamente ao final dessa seção.

Metodologia: devem ser fornecidas todas as características do material pertinente ao assunto da pesquisa (ex.: amostras de tecido, sujeitos da pesquisa). Os métodos experimentais, analíticos e estatísticos devem ser descritos de forma concisa, porém suficientemente detalhada para permitir que outros possam repetir o trabalho. Os dados de fabricantes ou fornecedores de produtos, equipamentos, ou softwares devem ser explicitados na primeira menção feita nesta seção, como segue: nome do fabricante, cidade e país. Os programas de computador e métodos estatísticos também devem ser especificados. A menos que o objetivo do trabalho seja comparar produtos ou sistemas específicos, os nomes comerciais de técnicas, bem como de produtos ou equipamentos científicos ou clínicos só devem ser citados nas seções de "Metodologia" e "Agradecimentos", de acordo com o caso. No restante do manuscrito, inclusive no título, devem ser utilizados os nomes genéricos. Nos manuscritos que envolvam radiografias, microrradiografias ou imagens de MEV, devem ser incluídas as seguintes informações: fonte de radiação, filtros e níveis de kV utilizados. Os manuscritos que relatem estudos em humanos devem incluir comprovação de que a pesquisa foi conduzida eticamente de acordo com a Declaração de Helsinki (*World Medical Association*, <http://www.wma.net/en/30publications/10policies/b3/>). O número de protocolo de aprovação emitido por um Comitê Institucional de Ética deve ser citado. Estudos observacionais devem seguir as diretrizes STROBE (<http://strobe-statement.org/>) e o check list deve ser submetido. Ensaios clínicos devem ser relatados de acordo com o protocolo padronizado da *CONSORT Statement* (<http://www.consort-statement.org/>), revisões sistemáticas e meta-análises devem seguir o PRISMA (<http://www.prisma-statement.org/>), ou Cochrane (<http://www.cochrane.org/>).

Ensaio Clínico

Os ensaios clínicos segundo as diretrizes CONSORT disponíveis em www.consort-statement.org. O número de registro do ensaio clínico e o nome do registro da pesquisa serão publicados com o artigo.

Manuscritos que relatem a realização de estudos em animais devem também incluir comprovação de que a pesquisa foi conduzida de maneira ética, e o número de protocolo de aprovação emitido por um Comitê Institucional de Ética deve ser citado. Caso a pesquisa envolva um registro gênico, antes da submissão, as novas sequências genéticas devem ser incluídas num banco de dados público, e o número de acesso deve ser fornecido à **BOR**. Os autores poderão utilizar as seguintes bases de dados:

- GenBank: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Genbank/submit>
- EMBL: <http://www.ebi.ac.uk/embl/Submission/index.html>
- DDBJ: <http://www.ddbj.nig.ac.jp>

As submissões de manuscritos que incluam dados de *microarray* devem incluir a informação recomendada pelas diretrizes MIAME (*Minimum Information About a Microarray Experiment* - <http://www.mged.org/index.html>) e/ou descrever, na forma de itens, como os detalhes experimentais foram submetidos a uma das bases de dados publicamente disponíveis, tais como:

- ArrayExpress: <http://www.ebi.ac.uk/arrayexpress/>
- GEO: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/>

Resultados: devem ser apresentados na mesma ordem em que o experimento foi realizado, conforme descrito na seção "Metodologia". Os resultados mais significativos devem ser descritos. Texto, tabelas e figuras não devem ser repetitivos. Os resultados com significância estatística devem vir acompanhados dos respectivos valores de p.

Tabelas: devem ser numeradas e citadas consecutivamente no texto principal, em algarismos arábicos. As tabelas devem ser submetidas separadamente do texto em formato DOC, DOCX ou RTF.

Discussão: deve discutir os resultados do estudo em relação à hipótese de trabalho e à literatura pertinente. Deve descrever as semelhanças e as diferenças do estudo em relação aos outros estudos correlatos encontrados na literatura, e fornecer explicações para as possíveis diferenças encontradas. Deve também identificar as limitações do estudo e fazer sugestões para pesquisas futuras.

Conclusões: devem ser apresentadas concisamente e estar estritamente fundamentadas nos resultados obtidos na pesquisa. O detalhamento dos resultados, incluindo valores numéricos etc., não deve ser repetido.

Agradecimentos: as contribuições de colegas (por assistência técnica, comentários críticos etc.) devem ser informadas, e qualquer vinculação de autores com firmas comerciais deve ser revelada. Esta seção deve descrever a(s) fonte(s) de financiamento da pesquisa, incluindo os respectivos números de processo.

Plágio

A **BOR** emprega um sistema de detecção de plágio. Ao enviar o seu manuscrito para a Revista, este manuscrito poderá ser rastreado. Isto não tem relação com a simples repetição de nomes / filiações, mas envolve frases ou textos utilizados. **Referências:** só serão aceitas como referências as publicações em periódicos revisados por pares. Não serão aceitos como referências manuscritos em processo de redação, dissertações, teses, ou resumos apresentados em congressos. Devem ser evitadas referências a livros.

As citações de referências devem ser identificadas no texto por meio de números arábicos sobrescritos. A lista completa de referências deve vir após a seção de "Agradecimentos", e as referências devem ser numeradas e apresentadas de acordo com o Estilo Vancouver, em conformidade com as diretrizes fornecidas pelo *International Committee of Medical Journal Editors*, conforme apresentadas em *Uniform Requirements for Manuscripts Submitted to Biomedical Journals* (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK7256/>). Os títulos de periódicos devem ser abreviados de acordo com o *List of Journals Indexed in Index Medicus* (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nlmcatalog/journals>). A correta apresentação das referências é de responsabilidade exclusiva dos autores.

Grafia de termos científicos: nomes científicos (binômios de nomenclatura microbiológica, zoológica e botânica) devem ser escritos por extenso, bem como os nomes de compostos e elementos químicos, na primeira menção no texto principal.

Unidades de medida: devem ser apresentadas de acordo com o Sistema Internacional de Medidas (<http://www.bipm.org> ou <http://www.inmetro.gov.br/consumidor/unidLegaisMed.asp>).

Notas de rodapé no texto principal: devem ser indicadas por meio de asteriscos e restritas ao mínimo indispensável.

Figuras: fotografias, micrografias e radiografias devem ter uma largura mínima de 10 cm, resolução mínima de 500 dpi, e devem ser fornecidas em formato TIFF. Gráficos, desenhos, esquemas e demais ilustrações vetoriais devem ser fornecidos em formato PDF. Todas as figuras devem ser submetidas, individualmente, em arquivos separados (não inseridas no arquivo de texto). As figuras devem ser numeradas e citadas consecutivamente no corpo do texto, em algarismos arábicos. As legendas das figuras devem ser inseridas todas juntas no final do texto, após as referências.

CARACTERÍSTICAS E FORMATAÇÃO DOS TIPOS DE MANUSCRITOS

Pesquisa Original

Devem ser limitados a 30.000 caracteres incluindo espaços (considerando-se introdução, metodologia, resultados, discussão, conclusão, agradecimentos, tabelas, referências e legendas de figuras). Será aceito um máximo de 8 (oito) figuras e 40 (quarenta) referências. O resumo deve conter, no máximo, 250 palavras.

Formatação - Arquivos de Texto

- Folha de rosto (*Title Page*)
- Texto principal (30.000 caracteres incluindo espaços)
- Resumo - máximo de 250 palavras
- Descritores - de 3 (três) a 5 (cinco) descritores principais
- Introdução
- Metodologia
- Resultados
- Discussão
- Conclusão
- Agradecimentos
- Tabelas
- Referências - máximo de 40 referências
- Legendas de figuras

Formatação - Arquivos de figuras

- Figuras - máximo de 8 (oito) figuras, conforme descrito acima.

Resumo de Pesquisa Original (*Short Communication*)

Devem ser limitados a 10.000 caracteres incluindo espaços (considerando-se, introdução, metodologia, resultados, discussão, conclusão, agradecimentos, tabelas, referências e legendas de figuras). É permitido um máximo de 2 (duas) figuras e 12 (doze) referências. O resumo deve conter, no máximo, 100 palavras.

Formatação - Arquivos de texto

- Folha de rosto
- Texto principal (10.000 caracteres incluindo espaços)
- Resumo - máximo de 100 palavras
- Descritores - de 3 (três) a 5 (cinco) descritores principais
- Introdução
- Metodologia
- Resultados
- Discussão
- Conclusão
- Agradecimentos
- Tabelas
- Referências - máximo de 12 referências
- Legendas de figuras

Formatação - Arquivos de figuras

- Figuras - máximo de 2 (duas) figuras, conforme descrito acima.

Revisão Crítica de Literatura

A submissão desse tipo de manuscrito será realizada apenas a

convite da Comissão de Publicação da BOR. Todos os manuscritos serão submetidos à revisão por pares. Esse tipo de manuscrito deve ter um conteúdo descritivo-discursivo, com foco numa apresentação e discussão abrangente de questões científicas importantes e inovadoras, e ser limitado a 30.000 caracteres incluindo espaços (considerando-se, introdução, metodologia, resultados, discussão, conclusão, agradecimentos, tabelas, referências e legendas de figuras). Incluir uma apresentação clara do objeto científico de interesse, argumentação lógica, uma análise crítica metodológica e teórica dos estudos e uma conclusão resumida. É permitido um máximo de 6 (seis) figuras e 50 (cinquenta) referências. O resumo deve conter, no máximo, 250 palavras.

Formatação - Arquivos de texto

- Folha de rosto
- Texto principal (30.000 caracteres incluindo espaços)
- Resumo - máximo de 250 palavras
- Descritores - de 3 (três) a 5 (cinco) descritores principais
- Introdução
- Metodologia
- Resultados
- Discussão
- Conclusão
- Agradecimentos
- Tabelas
- Referências - máximo de 50 referências
- Legendas de figuras

Formatação - Arquivos de figuras

- Figuras - máximo de 6 (seis) figuras, conforme descrito acima.

Revisão Sistemática e Meta-Análise

Ao resumir os resultados de estudos originais, sejam eles quantitativos ou qualitativos, esse tipo de manuscrito deve responder a uma questão específica, ser limitado a 30.000 caracteres, incluindo espaços, e seguir o estilo e formato Cochrane (www.cochrane.org). O manuscrito deve informar detalhadamente como se deu o processo de busca e recuperação dos trabalhos originais, o critério de seleção dos estudos incluídos na revisão e fornecer um resumo dos resultados obtidos nos estudos revisados (com ou sem uma abordagem de meta-análise). Não há limite para a quantidade de referências e figuras. Tabelas e figuras, caso sejam incluídas, devem apresentar as características dos estudos revisados, as intervenções que foram comparadas e respectivos resultados, além dos estudos excluídos da revisão. Demais tabelas e figuras pertinentes à revisão devem ser apresentadas como descrito anteriormente. O resumo deve conter, no máximo, 250 palavras.

Formatação - Arquivos de texto

- Folha de rosto
- Texto principal (30.000 caracteres incluindo espaços)
- Resumo - máximo de 250 palavras
- Formulação da pergunta
- Localização dos estudos
- Avaliação crítica Coleta de dados
- Análise e apresentação dos dados
- Aprimoramento
- Atualização da revisão
- Referências - não há limite para a quantidade de referências
- Tabelas

Formatação - Arquivos de figuras

- Figuras - não há limite para a quantidade de figuras

Carta ao Editor

Cartas devem incluir evidências que sustentem a opinião do(s) autor(es) sobre o conteúdo científico ou editorial da BOR, e ser limitadas a 500 palavras. Figuras ou tabelas não são permitidas.

TERMO DE TRANSFERÊNCIA DE DIREITOS AUTORAIS E DECLARAÇÕES DE RESPONSABILIDADE

O manuscrito submetido para publicação deve ser acompanhado do Termo de Transferência de Direitos Autorais e Declarações de Responsabilidade, disponível no sistema online e de preenchimento obrigatório.

"CHECKLIST" PARA SUBMISSÃO INICIAL

- Arquivo de folha de rosto (*Title Page*, em formato DOC, DOCX ou RTF).
- Arquivo do texto principal (*Main Document*, manuscrito), em formato DOC, DOCX ou RTF.
- Tabelas, em formato DOC, DOCX ou RTF.
- Declaração de interesses e de financiamento, submetida em um documento separado e em formato PDF. (se aplicável)
- Justificativa para a participação de cada um dos autores, fornecida em um documento separado e em formato PDF.
- Fotografias, micrografias e radiografias (largura mínima de 10 cm e resolução mínima de 500 DPI) em formato TIFF. (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/pub/filespec-images/>)
- Gráficos, desenhos, esquemas e demais ilustrações vetoriais

em formato PDF.

- Cada uma das figuras deve ser submetida em arquivos separados e individuais (não inseridas no arquivo de texto).

EXEMPLOS DE REFERÊNCIAS

Periódicos

Goracci C, Tavares AU, Fabianelli A, Monticelli F, Raffaelli O, Cardoso PC, et al. The adhesion between fiber posts and root canal walls: comparison between microtensile and push-out bond strength measurements. *Eur J Oral Sci.* 2004 Aug;112(4):353-61.

Bhutta ZA, Darmstadt GL, Hasan BS, Haws RA. Community-based interventions for improving perinatal and neonatal health outcomes in developing countries: a review of the evidence. *Pediatrics.* 2005;115(2 Suppl):519-617. doi:10.1542/peds.2004-1441.

Usunoff KG, Itzev DE, Rolfs A, Schmitt O, Wree A. Nitric oxide synthase-containing neurons in the amygdaloid nuclear complex of the rat. *Anat Embryol (Berl).* 2006 Oct 27. Epub ahead of print. doi: 10.1007/s00429-006-0134-9

Walsh B, Steiner A, Pickering RM, Ward-Basu J. Economic evaluation of nurse led intermediate care versus standard care for post-acute medical patients: cost minimisation analysis of data from a randomised controlled trial. *BMJ.* 2005 Mar 26;330(7493):699. Epub 2005 Mar 9.

Artigos com Título e Texto em Idioma Diferente do Inglês

Li YJ, He X, Liu LN, Lan YY, Wang AM, Wang YL. [Studies on chemical constituents in herb of *Polygonum orientale*]. *Zhongguo Ahong Yao Za Zhi.* 2005 Mar;30(6):444-6. Chinese.

Suplementos ou Edições Especiais

Pucca Junior GA, Lucena EHG, Cawahisa PT. Financing national policy on oral health in Brazil in the context of the Unified Health System. *Braz Oral Res.* 2010 Aug;24 Spec Iss 1:26-32.

Periódicos Online

Barata RB, Ribeiro MCSA, De Sordi M. Desigualdades sociais e homicídios na cidade de São Paulo, 1998. *Rev Bras Epidemiol.* 2008;11(1):3-13 [cited 2008 Feb 23]. Available from: <http://www.scielo.org/pdf/rbepid/v11n1/01.pdf>.

Livros

Stedman TL. Stedman's medical dictionary: a vocabulary of medicine and its allied sciences, with pronunciations and derivations. 20th ed. Baltimore: Williams & Wilkins; 1961. 259 p.

Livros Online

Foley KM, Gelband H, editors. Improving palliative care for cancer [monograph on the Internet]. Washington: National Academy Press; 2001 [cited 2002 Jul 9]. Available from: <http://www.nap.edu/books/0309074029/html/>.

Websites

Cancer-Pain.org [homepage on the Internet]. New York: Association of Cancer Online Resources, Inc.; c2000 [cited 2002 Jul 9]. Available from: <http://www.cancer-pain.org/>.

Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística [homepage]. Brasília (DF): Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística; 2010 [cited 2010 Nov 27]. Available from: <http://www.ibge.gov.br/home/default.php>.

World Health Organization [homepage]. Geneva: World Health Organization; 2011 [cited 2011 Jan 17]. Available from: <http://www.who.int/en/>