



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE PIRACICABA



MÁRCIA THAÍS POCHAPSKI
CIRURGIÃ DENTISTA

ESTUDO DOS EFEITOS DA *Ipomoea batatas* (L.) Lam. NA RESPOSTA
INFLAMATÓRIA E NO BIOFILME DENTAL.

Tese apresentada à Faculdade de Odontologia de
Piracicaba, Universidade Estadual de Campinas,
para obtenção de Título de Doutora em
Odontologia, Área de Concentração em
Farmacologia, Anestesiologia e Terapêutica.

Orientador:

Prof. Dr. Francisco Carlos Groppo

Piracicaba, SP

2010

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA

BIBLIOTECA DA FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE PIRACICABA

Bibliotecária: Elis Regina Alves dos Santos – CRB-8ª / 8099

P75e

Pochapski, Márcia Thaís.

Estudo dos efeitos da Ipomoea batatas (L.) Lam. na resposta inflamatória e no biofilme dental / Márcia Thaís Pochapski. -- Piracicaba, SP: [s.n.], 2010.

Orientador: Francisco Carlos Groppo.
Tese (Doutorado) – Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Odontologia de Piracicaba.

1. Fitoterapia. 2. Gengivite. 3. Placa dentária. I. Groppo, Francisco Carlos. II. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Odontologia de Piracicaba. III. Título.

(eras/fop)

Título em Inglês: Evaluation of the effects of Ipomoea batatas (L.) Lam. on inflammatory response and dental biofilm

Palavras-chave em Inglês (Keywords): 1. Phytotherapy. 2. Gingivitis. 3. Dental plaque

Área de Concentração: Farmacologia, Anestesiologia e Terapêutica

Titulação: Doutor em Odontologia

Banca Examinadora: Francisco Carlos Groppo, Gislaíne Denise Czylusniak, Sinvaldo Baglie, Gilson César Nobre Franco, Eduardo Dias de Andrade

Data da Defesa: 26-11-2010

Programa de Pós-Graduação em Odontologia



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
Faculdade de Odontologia de Piracicaba



A Comissão Julgadora dos trabalhos de Defesa de Tese de Doutorado, em sessão pública realizada em 26 de Novembro de 2010, considerou a candidata MÁRCIA THAÍS POCHAPSKI aprovada.

A handwritten signature in blue ink, appearing to read "F. C. Groppo".

Prof. Dr. FRANCISCO CARLOS GROPPPO

A handwritten signature in blue ink, appearing to read "Gislaïne D. Człusniak".

Prof. Dr. GISLAÏNE DENISE CZŁUSNIAK

A handwritten signature in blue ink, appearing to read "Sivaldo Baglie".

Prof. Dr. SINVALDO BAGLIE

A handwritten signature in blue ink, appearing to read "Gilson Cesar Nobre Franco".

Prof. Dr. GILSON CESAR NOBRE FRANCO

A handwritten signature in blue ink, appearing to read "Eduardo Dias de Andrade".

Prof. Dr. EDUARDO DIAS DE ANDRADE

DEDICATÓRIA

Ao meu esposo Fábio André dos Santos,

Por fazer parte da minha vida, estar ao meu lado em todos os momentos e por seu incentivo constante. Sem você seria muito mais difícil chegar até aqui.

Aos meus pais José e Antônia e meu irmão Marcelo,

Pelo apoio e compreensão em todas as minhas decisões.

Com muito carinho dedico este trabalho.

AGRADECIMENTOS

À toda minha família, pais, irmão, sogros e esposo pela confiança e carinho.

À Universidade Estadual de Campinas, por meio do Reitor Prof. Dr. Fernando Ferreira Costa.

À Faculdade de Odontologia de Piracicaba (FOP – UNICAMP), por meio do diretor Prof. Dr. Jacks Jorge Junior.

Ao Departamento de Ciências Fisiológicas da FOP, por meio da chefe de departamento Prof^a. Dr^a. Cínthia Pereira Machado Tabchoury.

À Prof^a. Dr^a. Renata Cunha Matheus Rodrigues Garcia, coordenadora dos cursos de Pós-Graduação da FOP/UNICAMP e à Prof^a. Dr^a. Cínthia Pereira Machado Tabchoury, coordenadora do Programa de Pós-Graduação em Odontologia.

À FAPESP (Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo) pela bolsa de doutorado concedida (processo # 2008/00734-6).

Ao meu orientador, Prof. Dr. Francisco Carlos Groppo, pela orientação, confiança e incentivo.

Aos professores da Área de Farmacologia, Anestesiologia e Terapêutica Dr^a Maria Cristina Volpato, Dr. Francisco Carlos Groppo, Dr. José Ranali, Dr. Eduardo Dias de Andrade, Dr.

Pedro Luiz Rosalen e a todos os docentes do Programa de Pós-Graduação em Odontologia de Piracicaba.

Ao Prof. Dr. Paulo Vitor Farago, da Universidade Estadual de Ponta Grossa (UEPG), pelos conselhos, paciência, amizade e orientação em toda parte fitoquímica e farmacotécnica.

Ao Prof. Dr. Luis Antônio Esmerino, Prof^ª. Dr^ª Elizabete Brasil dos Santos e Prof. Ms. Paulo Tomazinho pela colaboração nos testes microbiológicos.

Às Professoras Dr^ª Maria Cristina Volpato, Dr^ª Karina Cogo e Dr^ª Cristiane de Cássia Bergamaschi pela participação na banca de qualificação e essencial contribuição na finalização deste trabalho.

Aos técnicos de laboratório a UEPG, Luzia e Maurício (microbiologia) e especialmente, Bete e Valdir (farmacotécnica) pela colaboração, inclusive aos domingos, e agradável companhia.

À Universidade Estadual de Ponta Grossa (UEPG) por meio da chefe do Departamento de Odontologia Prof^ª. Dr^ª Denise Stadler Wambier pela oportunidade de desenvolver este trabalho.

À aluna de graduação em Odontologia da UEPG, Letícia Antonelo Campos pela ajuda nas fases laboratoriais e clínica deste estudo.

À Eliana Cristina Fosquiera pela dedicação e envolvimento na fase clínica do trabalho.

Aos colegas de Pós-Graduação Andreza, Bruno, Cristiane, Daniela, Gilson, Ivy, Júlio Karina, Leandro, Leila, Luciana Berto, Luciana (Lóci) Michelli, Myrella, Patrícia Zago, Paulo, Sidney e Vanessa, por dividir momentos alegres, mas principalmente momentos difíceis durante o curso.

Às amigas Luciana (Lóci) e Patrícia Zago, pessoas que admiro muito. Obrigada por tudo.

À Eliane e Elisa, mesmo eu estando distante, nunca me esqueceram e sempre me incentivaram e acalmaram nos momentos tensos da Pós-Graduação.

Aos Professores Dr. Francisco Carlos Groppo, Dra. Gislaine Denise Czlusniak, Dr. Sinvaldo Baglie, Dr. Gilson César Nobre Franco e Dr. Eduardo Dias de Andrade, pela presença na banca de defesa, oportunas considerações e palavras de incentivo.

À todos os funcionários da FOP.

A todos que, mesmo não citados, de alguma maneira contribuíram para a realização deste trabalho.

RESUMO

O objetivo dessa pesquisa foi realizar o *screening* fitoquímico, quantificar metabólitos secundários e determinar a atividade antioxidante do extrato bruto hidroalcoólico das folhas de *Ipomoea batatas* (L.) Lam. (batata-doce) (EBHBD). Foi determinada também sua toxicidade, atividade antimicrobiana e anti-inflamatória. Uma formulação farmacêutica em gel contendo o EBHBD foi desenvolvida para testar o seu efeito clínico no biofilme dental e gengivite em humanos. Os testes fitoquímicos foram realizados para determinar os componentes e quantificar os metabólitos secundários. A atividade antioxidante foi determinada pelo método do fosfomolibdênio. A análise toxicológica foi feita pelo teste de viabilidade celular e com o bioensaio utilizando *Artemia salina* (microcrustáceo). A análise microbiológica foi realizada por meio da sensibilidade em microrganismos aeróbios. A atividade anti-inflamatória foi avaliada em cultura de fibroblastos e com os testes de edema de orelha (camundongo) e pata (rato). A formulação em gel foi desenvolvida com EBHBD em hidroxietilcelulose, sendo conduzidos os testes de controle de qualidade (pH, densidade absoluta, consistência e avaliação microbiológica). O efeito do gel contendo EBHBD no biofilme dental e gengivite foi estudado utilizando um modelo de gengivite experimental parcial em humanos. Vinte e cinco indivíduos foram selecionados para participar deste estudo cruzado duplo-cego, no qual foram estabelecidos três períodos experimentais de 15 dias cada um com intervalo de 10 dias. Os pacientes foram submetidos a 3 tratamentos (T): T1- Gel placebo, T2- Gel contendo EBHBD a 10%; T3- Gel de clorexidina a 2% (controle positivo). Os parâmetros avaliados foram: índice de placa; índice de sangramento marginal modificado; fluido gengival e análise microbiológica do biofilme supragengival. Os dentes analisados foram: 15, 16, 35 e 36. Os resultados do estudo fitoquímico demonstraram a presença de flavonóides, alcalóides, antraquinonas, taninos e saponinas. A quantificação de metabólitos secundários mostrou em 100 g de material vegetal seco: fenólicos totais: $662,02 \pm 28,91$ mg; alcalóides: $345,65 \pm 15,52$ mg e antraquinonas: $328,44 \pm 8,17$ mg. A média da atividade antioxidante relativa do EBHBD foi igual a 43% e do gel foi 57%, em relação a 100% do total de atividade antioxidante atribuída ao ácido ascórbico. O EBHBD foi considerado atóxico e sem atividade antimicrobiana de acordo com os testes realizados.

Foi observada redução na liberação de citocinas pró-inflamatórias em cultura de fibroblastos gengivais de humano ($p < 0,05$) e diminuição da atividade anti-inflamatória no edema de orelha em camundongos (redução de 27%) e no edema de pata em ratos (redução de 24%). No estudo clínico não se observaram diferenças estatísticas ($p > 0,05$) entre os parâmetros avaliados (índice de placa, sagramento marginal, fluído gengival e contagem de unidades formadoras de colônias de biofilme supragengival). Dentro das limitações deste estudo, sugere-se que o EBHBD apresentou moderada atividade antioxidante e propriedades anti-inflamatórias in vitro, porém não apresentou efeito clínico sobre biofilme dental e inflamação gengival.

Palavras-chave: *Ipomoea batatas*, fitoterapia, gengivite, placa dentária.

ABSTRACT

The aim of this research was to perform the phytochemical screening, secondary metabolites quantification and determine the antioxidant activity of crude extract of the leaves of *Ipomoea batatas* (L.) Lam. (sweet potato) (EBHBD). The crude toxicity, antimicrobial activity and anti-inflammatory properties were also determined. A gel pharmaceutical formulation containing EBHBD was developed and evaluated the clinical effect on dental biofilm and gingivitis in humans. Phytochemical tests were conducted to determine the components and quantify secondary metabolites. The antioxidant activity was determined by the phosphomolybdenum method. Toxicological bioassays were carried out on brine shrimp (*Artemia salina*) and cell viability test. The Antimicrobial activity was performed on aerobic microorganisms. The anti-inflammatory activity was assessed in fibroblast cell culture and on the ear (mouse) and paw (rats) edema tests. The EBHBD hydroxietilicelulose gel formulation was developed and control quality tests were conducted (pH, absolute density, consistence and microbiological analysis). The effect of EBHBD gel on plaque and gingivitis was studied using an experimental model of partial gingivitis in humans. Twenty-five individuals were selected to participate in this double-blind crossover study, with three experimental periods of 15 days each with an interval of 10 days. The patients underwent three treatments (T): T1- Placebo gel, T2- 10% EBHBD gel T3- 2% chlorhexidine gel (positive control). The parameters evaluated were: plaque index, modified marginal bleeding index, gingival fluid and microbiological analysis of supragingival biofilm. Teeth evaluated: 15, 16, 35 and 36. The results demonstrated the presence of flavonoids, alkaloids, anthraquinones, tannins and saponins. The secondary metabolites quantification showed in 100 g of dried plant material: phenolic: 662.02 ± 28.91 mg; alkaloids: 345.65 ± 15.52 mg and anthraquinones: 328.44 ± 8.17 mg. The EBHBD antioxidant activity relative average was 43% and the 10% EBHBD gel was 57% in comparison of the ascorbic acid antioxidant activity (100%). The EBHBD was considered no toxic and no antimicrobial activity according to tests. The EBHBD reduced the release of pro-inflammatory cytokines on human gingival fibroblast cell culture ($p < 0.05$) and decreased anti-inflammatory activity on ear edema in mouse (27% reduction) and paw edema in rats (24% reduction). In the clinical study there were no statistical

differences ($p > 0.05$) among the parameters (plaque index, marginal gingival bleeding, gingival fluid and colony-forming unit of supragingival biofilm). Within the limits of this study, it was possible suggest that the EBHBD showed moderate antioxidant and anti-inflammatory properties in vitro, but showed no clinical effect on plaque and gingivitis.

Keywords: *Ipomoea batatas*, phytotherapy, gingivitis, dental plaque

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	1
2 REVISÃO DE LITERATURA	3
2.1 Biofilme Dental	3
2.2 Doença Periodontal	3
2.3 Gengivite induzida por biofilme bacteriano	4
2.4 Resposta imunoinflamatória do hospedeiro ao biofilme bacteriano	4
2.5 Tratamento da gengivite induzida pelo biofilme bacteriano	5
2.6 Fitoterapia	7
2.7 O uso de fitoterápicos na Odontologia	9
2.8 Características da espécie vegetal – <i>Ipomoea batatas</i> L. (Lam.)	9
2.9 Atividade fisiológica da batata-doce	10
3 PROPOSIÇÃO	13
4 MATERIAL E MÉTODOS	14
4.1 Colheita e processamento do material vegetal	14
4.2 Determinação do conteúdo de umidade residual	14
4.3 Extração por maceração	14
4.4 Testes fitoquímicos	15
4.5 Ensaio fitoquímicos	16
4.5.1 Pesquisa de flavonóides	16
4.5.2 Pesquisa de Alcalóides	17
4.5.3 Pesquisa de Antraquinonas	17
4.5.4 Pesquisa de Cumarinas	17

4.5.5 Pesquisa de Taninos	18
4.5.6 Pesquisa de Saponinas	18
4.5.7 Quantificação dos metabólitos secundários	19
4.5.7.1 Fenólicos totais	19
4.5.7.2 Alcalóides	19
4.5.7.3 Antraquinonas	20
4.6 Avaliação das atividades biológicas do EBHBD	20
4.6.1 Atividade Antioxidante	20
4.6.1.1 Método do fosfomolibdênio	21
4.6.2 Avaliação do edema de orelha	22
4.6.2.1 Edema de orelha induzido pela aplicação tópica do TPA	22
4.7 Manipulação da formulação em gel do EBHBD	23
4.7.1 Controle da qualidade das formulações farmacêuticas	23
4.7.1.1 Determinação dos valores de pH	23
4.7.1.2 Determinação da densidade absoluta	24
4.7.1.3 Determinação da consistência	24
4.7.1.4 Avaliação microbiológica	24
4.7.2 Edema de pata induzido por LPS	24
4.7.3 Atividade antioxidante total do gel	25
4.7.4 Determinação da concentração inibitória mínima (CIM) do gel contendo EBHBD	25
4.7.5 Cultura de fibroblastos de gengiva de humanos	26
4.7.6 Efeito do tratamento do gel contendo EBHBD sobre a liberação de fator de necrose tumoral alfa (TNF- α) e interleucina 1 beta (IL-1 β)	27

induzidas por LPS em fibroblastos gengivais in vitro	
4.7.6.1 Dosagem de TNF- α e IL-1 β	27
4.7.7 Testes de Toxicidade	28
4.7.7.1 Viabilidade celular pelo método MTT	28
4.7.7.2 Teste de toxicidade da <i>Artemia salina</i>	28
4.7.7.2.1 Diluição do EBHBD e géis	28
4.7.7.2.2 Solução salina para eclosão dos ovos de <i>Artemia salina</i>	28
4.7.7.2.3 Cultura da <i>Artemia salina</i>	29
4.7.7.2.4 Determinação da toxicidade sobre a <i>Artemia salina</i>	29
4.8 Ensaio clínico	29
4.8.1 Seleção da amostra	29
4.8.2 Procedimentos clínicos – fase preliminar	30
4.8.3 Parâmetros clínicos Avaliados	34
4.8.3.1 Índice de placa	34
4.8.3.2 Índice de sangramento marginal	34
4.8.3.3 Treinamento e reprodutibilidade dos parâmetros clínicos	35
4.8.3.4 Treinamento da metodologia	36
4.8.3.5 Avaliação do fluido gengival	36
4.8.3.6 Avaliação microbiológica	37
4.9 Análise estatística	38
5 RESULTADOS	39
5.1 Testes fitoquímicos	39

5.1.1 Ensaio fitoquímico para flavonóides, alcalóides, antraquinonas, cumarinas, taninos e saponinas	39
5.1.2 Quantificação dos metabólitos secundários	40
5.1.2.1 Quantificação dos fenólicos totais	40
5.1.2.2 Quantificação de alcalóides	40
5.1.2.3 Quantificação de antraquinonas	41
5.2 Avaliação das atividades biológicas do EBHBD	41
5.2.1 Atividade Antioxidante	41
5.2.1.1 Método do fosfomolibdênio	41
5.2.2 Avaliação do edema de orelha	41
5.2.2.1 Edema de orelha induzido pela aplicação tópica do TPA	41
5.3 Manipulação da formulação em gel do EBHBD	42
5.3.1 Controle da qualidade das formulações farmacêuticas	44
5.3.1.1 Determinação dos valores de pH, densidade absoluta e consistência	44
5.3.1.2 Avaliação microbiológica	44
5.3.2 Edema de pata induzido por LPS	44
5.3.3 Atividade antioxidante total do gel	46
5.3.4 Determinação da concentração inibitória mínima (CIM) do gel contendo EBHBD	46
5.3.5 Efeito do tratamento do gel contendo EBHBD sobre a liberação de TNF- α e IL-1 β induzidas por LPS em fibroblastos gengivais de humanos in vitro	46
5.4 Testes de toxicidade	48

5.4.1 Viabilidade celular pelo método MTT	48
5.4.2 Teste da <i>Artemia salina</i>	48
5.5 Ensaio clínico	49
5.5.1 Parâmetros clínicos avaliados	49
5.5.1.1 Treinamento e reprodutibilidade dos parâmetros clínicos	49
5.5.1.2 Seleção da amostra	50
5.5.1.3 Índice de placa	51
5.5.1.4 Índice de sangramento marginal	53
5.5.1.5 Avaliação do volume do fluido gengival	56
5.5.1.6 Avaliação microbiológica	56
6 DISCUSSÃO	58
7 CONCLUSÃO	67
REFERÊNCIAS	68
ANEXO	82
1 Parecer comissão de ética	82
2 Ficha clínica confeccionada para o estudo	83

1 INTRODUÇÃO

As plantas medicinais vêm sendo mundialmente empregadas na medicina popular. A Organização Mundial da Saúde (OMS) estima que 80% da população mundial utiliza algum tipo de planta ou preparações destas, no que se refere à atenção primária de saúde. O reconhecimento de seu valor como recurso clínico, farmacêutico e econômico tem crescido progressivamente em vários países, os quais vêm normatizando e legislando acerca dos diferentes critérios de segurança, eficácia e qualidade que devem envolver esses produtos. Embora o uso de vários agentes fitoterápicos seja amplo, até hoje são escassos os estudos sobre as suas constituições químicas, atividades biológicas e mecanismo de ação, particularmente nas patologias bucais (Marchese *et al.*, 2004; Medeiros *et al.*, 2004).

O Brasil é o país com maior diversidade genética vegetal do mundo, contando com mais de 55.000 espécies catalogadas. As plantas são importantes fontes de produtos naturais biologicamente ativos, muitos dos quais são princípios para síntese de um grande número de fármacos. Apesar do aumento do estudo nesta área, os dados disponíveis revelam que apenas 15 a 17% das plantas foram estudadas quanto ao seu potencial medicinal (Martins *et al.*, 2000; Groppo *et al.*, 2008).

O uso indiscriminado de plantas sem qualquer conhecimento fitoquímico, farmacológico e principalmente toxicológico é de grande preocupação para a saúde. Isto acontece com a maioria das espécies vegetais consumidas pela população. A identificação correta destas espécies, sua forma de uso, posologia e controle de qualidade também constituem questões a serem resolvidas (Billeter *et al.*, 1990; Redzic *et al.*, 2005; Groppo *et al.*, 2008).

Embora encontremos relatos na literatura de plantas medicinais utilizadas no tratamento de afecções bucais, tendo estas, propriedades anti-inflamatórias, anti-hemorragicas, analgésicas e cicatrizantes, os fitoterápicos ainda são pouco utilizados nos tratamentos odontológicos. Pesquisas mostram que agentes como óleos essenciais do cajueiro (*Anacardium occidentale* L.) e do cravo (*Eugenia caryophyllata* T.) são indicados para odontalgias (Groppo *et al.*, 2008). A romã (*Punica granatum* Linn) e o alho (*Allium*

sativum) possuem atividade antimicrobiana sobre estreptococos, além de ser usada contra gengivite e lesões bucais (Groppo *et al.*, 2002; Groppo *et al.*, 2007).

A *Ipomoea* (batata-doce), planta da família das convolvuláceas, apresenta propriedades antimicrobianas, antifúngicas e vaso-relaxantes (Locher *et al.*, 1995; Perusquia *et al.*, 1995; Reynolds *et al.*, 1995). Uma atividade protetora tecidual foi identificada a partir do isolamento da esporamina, uma substância que corresponde de 60 a 80% do total de proteínas solúveis encontrada no túber e folhas da *Ipomoea batatas* (L.) Lam. e que apresenta atividade inibitória sobre a tripsina, uma proteína que hidrolisa ligações peptídicas e apresenta especificidade em relação ao tipo de substrato a ser hidrolisado (Yeh *et al.*, 1997). Bochechos com chá das folhas são utilizados popularmente para o tratamento de lesões na mucosa bucal e odontalgias (Borba & Macedo, 2006).

Sendo um alimento consumido em larga escala no mundo inteiro, os relatos de toxicidade são praticamente nulos. De fato, os poucos relatos de toxicidade são em animais, particularmente gado bovino, que se alimenta de batata-doce comprometida por fungos (Thibodeau *et al.*, 2004; Chen *et al.*, 2008; Miyazaki *et al.*, 2008; Philpott *et al.*, 2009). Além disso, sendo produto vegetal cultivável em praticamente qualquer época do ano, a utilização da batata-doce não acarretaria um extrativismo predatório desenfreado, como acontece com outras espécies de plantas mais raras e poderia, inclusive, contribuir com a economia, alavancando pequenos produtores.

Pretende-se, assim, com este estudo realizar o *screening* fitoquímico, quantificar metabólitos secundários e determinar a atividade antioxidante do EBHBD. Será determinada também sua toxicidade, atividade antimicrobiana e anti-inflamatória. Uma formulação farmacêutica em gel contendo o EBHBD será desenvolvida para ser utilizada localmente na cavidade bucal, em um modelo de gengivite experimental em humanos. Estudos dessa natureza são necessários, pois podem estimular os pacientes e profissionais da área de saúde bucal a adotar a fitoterapia em seu esquema terapêutico, bem como a orientar a própria população ao uso adequado de tais substâncias, conhecendo os seus efeitos reais, as suas contra-indicações e os seus riscos.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Biofilme dental

O biofilme é formado principalmente por uma associação de vários microrganismos que formam um ecossistema estruturado e dinâmico. O biofilme supragengival produz polissacarídeos extracelulares e glicoproteínas, que desempenham uma função de proteção e reserva nutricional. Esta estrutura permite uma inter-relação entre os microrganismos, além de fornecer barreiras químicas e físicas que podem limitar a ação dos mecanismos de defesa do hospedeiro ou a ação de agentes antimicrobianos (Socransky & Haffajee, 2005).

Condições gengivais em estado de saúde estão relacionadas a um biofilme supragengival com poucas camadas, sendo observados cocos gram-positivos (*Streptococcus* spp: *S. mutans*, *S. mitis*, *S. sanguis*, *S. oralis*; *Rothia dentocariosa*; *Staphylococcus epidermidis*), bacilos gram-positivos (*Actinomyces* spp: *A. viscosus*, *A. israelitas*, *A. gerencseriae*; *Corynebacterium* spp.) e poucos cocos gram-negativos (*Veillonella parvula*; *Neisseria* spp.). A proliferação contínua das bactérias do biofilme supragengival oferece condições para o estabelecimento de outras formas bacterianas. Estes colonizadores secundários promovem alterações no ecossistema do biofilme dental microbiano viabilizando a colonização de bactérias anaeróbias estritas. (Bernimoulin, 2003; Haffajee & Socransky, 2005).

2.2 Doença Periodontal

A doença periodontal pode ser definida como um processo inflamatório em que é possível observar envolvimento do periodonto de proteção e sustentação. É um processo inflamatório em que estão incluídas diversas formas de gengivite e periodontite. A doença periodontal sem tratamento pode progredir levando a perda óssea e conseqüente perda do dente. As doenças do periodonto podem ser classificadas em gengivites (induzidas e não induzidas por biofilme), periodontites (crônicas e agressivas), doenças periodontais necrosantes, abscessos periodontais, periodontite associada a lesões endodônticas, deformidades e condições adquiridas ou do desenvolvimento (Armitage, 1999; Kinane, 2001).

2.3 Gengivite induzida por biofilme bacteriano

A forma mais comum de doença periodontal em humanos é a gengivite induzida por biofilme bacteriano, podendo ser modificada por fatores sistêmicos. O processo inflamatório ocorre em presença dos microrganismos levando a uma alteração no periodonto marginal. A condição inflamatória no periodonto marginal é reversível após o estabelecimento de uma adequada higiene bucal, não resultando em danos para os tecidos periodontais do hospedeiro. A condição de saúde gengival pode ser descrita como um estado de equilíbrio entre os microrganismos bucais e o mecanismo de defesa do hospedeiro (Armitage, 1999).

O desenvolvimento de uma gengivite está associado com o desenvolvimento de um biofilme dental organizado, caracterizado por várias camadas, organizadas de acordo com as condições metabólicas e ambientais. Nestas camadas bacterianas, além de cocos gram-positivos, bastonetes e filamentos associados com gengivas saudáveis, o número de cocos gram-negativos, bastonetes e filamentos aparece aumentando o número de bactérias anaeróbias (*F. nucleatum*, *C. rectus*, *B. gracilis*, *P. loeschii*, *Capnocytophaga* spp., entre outras). As espécies envolvidas podem ser modificadas conforme as características ambientais locais, mas o padrão de colonização é sempre o mesmo (Bernimoulin, 2003; Haffajee & Socransky, 2005).

Diante de condições como ausência de higiene bucal, estudos clínicos têm demonstrado que os microrganismos colonizam rapidamente as superfícies dentais, sendo que os sinais clínicos da inflamação gengival se tornam aparente entre 10 a 21 dias (Kinane, 2001).

2.4 Resposta imunoinflamatória do hospedeiro ao biofilme bacteriano

Na gengivite induzida por biofilme bacteriano é possível observar alterações teciduais e imuno-inflamatória que incluem dilatação dos vasos e aumento da permeabilidade vascular, aumento do fluxo do fluido gengival (FG) e migração de neutrófilos polimorfonucleares (PMN) (Goodson, 2003). Os PMNs são identificados no ambiente do sulco gengival/ bolsa periodantal, FG e tecido inflamado. Possuem

mecanismos antimicrobianos altamente especializados que quando ativados, produzem mediadores quimiotáticos e vasoativos que perpetuam a resposta inflamatória do hospedeiro. O aumento do nível de PMN no FG ativa interleucina-8, sendo uma das primeiras mudanças associadas com a transição da saúde para doença (Kinane, 2001; Preshaw, 2008).

O FG é um exsudato/infiltrado inflamatório presente no sulco gengival ou bolsa periodontal. No início do processo da doença, enquanto o periodonto é clinicamente saudável, os colonizadores iniciais estão confinados à margem gengival; o fluxo do FG neste estágio é relativamente baixo, sendo composto principalmente de um transudato de proteínas plasmáticas. Resultados de estudos mostraram a presença de uma alta quantidade de mediadores inflamatórios nos sítios com gengivite em comparação com sítios saudáveis em indivíduos normais (Goodson, 2003).

Em sítios com gengivite o FG é composto por proteínas plasmáticas, microrganismos, células epiteliais descamadas, leucócitos PMNs, mediadores da resposta inflamatória e enzimas. Estes elementos podem ser indicadores de atividade inflamatória da doença periodontal, bem como de saúde gengival após o tratamento. (Goodson, 2003; Kantarci *et al.*, 2006). A determinação dos diferentes componentes do FG pode ser um método para determinar a atividade da doença periodontal, visto que, é possível caracterizar o perfil de resposta inflamatório do hospedeiro (Goodson, 2003; Kantarci *et al.*, 2006).

A coleta do FG é um procedimento não invasivo, sendo que a análise de seus componentes pode contribuir para o estabelecimento do diagnóstico periodontal. Inúmeros estudos têm analisado a associação entre a quantidade total ou níveis de concentração dos diferentes componentes do FG e a condição periodontal. (Delima & Van Dyke, 2003; Kantarci *et al.*, 2006).

2.5 Tratamento da gengivite induzida pelo biofilme bacteriano

Vários estudos mostram a relação do biofilme para o desenvolvimento de gengivite. O controle do biofilme por meio de agentes mecânicos e químicos é fundamental para

prevenir e controlar a gengivite (Kinane, 2001; Axelsson *et al.*, 2004; Tatakis & Trombelli, 2004; Van Der Weijden & Hioe, 2005).

O biofilme supragengival está exposto à saliva e aos mecanismos naturais de auto-limpeza existente na cavidade bucal, no entanto, embora tais mecanismos possam eliminar restos alimentares, não são suficientes para desestruturar o biofilme bacteriano, sendo a higiene bucal regular um pré-requisito para a manutenção de uma boa condição de saúde bucal (Van Der Weijden & Hioe, 2005).

Os recursos mecânicos de higiene bucal, na maioria das vezes são suficientes para controlar o biofilme dental, porém em algumas situações não se consegue atingir todos os objetivos somente com o controle mecânico, pois o mesmo requer tempo, motivação e destreza manual. Mesmo pacientes que são treinados e instruídos para manterem sua higiene satisfatória, na ausência de constantes reforços sobre educação em saúde, os níveis de cooperação diminuem significativamente com o tempo (Ciancio, 2003; Axelsson *et al.*, 2004; Albert-Kiszely *et al.*, 2007). Indivíduos com limitações físicas ou mentais, idosos, pacientes com dentes mal posicionados e/ou portadores de aparelhos ortodônticos fixos, podem apresentar dificuldades quanto à escovação dentária e uso do fio dental (Ciancio, 2003; Axelsson *et al.*, 2004).

Bochechos com anti-sépticos têm sido amplamente utilizados em Odontologia como auxiliares no controle do biofilme bacteriano e gengivite. É evidente que se um paciente melhora o controle do biofilme e conseqüentemente sua condição gengival, o uso de quimioterápicos como coadjuvantes pode não mais ser necessário (Ciancio, 2003; Albert-Kiszely *et al.*, 2007; Moran, 2008).

Anti-sépticos são agentes químicos que podem eliminar microrganismos, como bactérias, vírus e fungos ou interferir com sua reprodução ou metabolismo. Para que um agente anti-placa seja efetivo é necessário que tenha um amplo espectro de atividade antimicrobiana; substantividade às superfícies bucais; gosto agradável; apresentar baixa toxicidade e mínima influência na microbiota residente. Além disso, alguns agentes químicos possuem também propriedades anti-inflamatórias (Gaffar *et al.*, 1997; Ciancio, 2003).

Diversas agentes têm sido utilizados para o controle químico do biofilme dental, como óleos essenciais, triclosan, clorexidina, cloreto de cetilpiridínio, fluoreto estanoso, sais de zinco e alcalóides de plantas de várias espécies. Entretanto, ainda hoje, a clorexidina é considerada o padrão de referência dos agentes para o controle químico do biofilme dental (Albert-Kiszely *et al.*, 2007; Herrera *et al.*, 2007).

Os agentes químicos utilizados para o controle do biofilme dental não produzem grandes alterações no tipo ou quantidade da microbiota bucal. Não sendo são observados efeitos toxicológicos consideráveis nas concentrações quando utilizados como auxiliares no controle do biofilme. No entanto, a clorexidina, o fluoreto estanoso e o cloreto de cetilpiridínio, podem causar manchamento dos dentes e das mucosas, descamação epitelial, e alteração de paladar (Moran, 2008).

Devido às questões mencionadas acima, pesquisas buscam compostos terapêuticos similares a esses produtos, mas que tenham menos efeitos colaterais. Assim, verifica-se um grande avanço científico nos estudos com plantas medicinais que visam obter novos compostos com propriedades terapêuticas (Cechinel Filho & Yunes, 1998).

2.6 Fitoterapia

Fitoterápicos são definidos pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (Anvisa) como medicamentos obtidos a partir de plantas medicinais, empregando-se exclusivamente derivados de droga vegetal (extrato, tintura, óleo, cera e suco) (Anvisa, 2004). Um fitoterápico é caracterizado pelo conhecimento da eficácia e dos riscos de seu uso, assim como pela reprodutibilidade e constância de sua qualidade (Carvalho *et al.*, 2008). Não se considera medicamento fitoterápico aquele que, na sua composição, inclua substâncias ativas isoladas, de qualquer origem, nem as associações dessas com extratos vegetais (Anvisa, 2004).

O Brasil apresenta grande diversidade genética vegetal, contando com mais de 55 mil espécies catalogadas. Porém, os dados disponíveis indicam que apenas 15% a 17% das plantas brasileiras foram avaliadas quanto ao seu potencial medicinal. A Associação Brasileira das Empresas do Setor Fitoterápico, Suplemento Alimentar e de Promoção da

Saúde (Abifisa) estima que cerca de 82% da população brasileira utiliza ou já utilizou algum produto a base de fitoterápicos (Medeiros *et al.*, 2004; Carvalho *et al.*, 2008; Lorenzi & Matos, 2008; Abifisa, 2010).

As plantas são importantes fontes de produtos biologicamente ativos, muitos dos quais são os compostos químicos para a semi-síntese de um grande número de fármacos. Essas substâncias biologicamente ativas presentes nas plantas são chamadas de metabólitos secundários e são produzidas através de rotas biossintéticas diversas cujos compostos de partida são os metabólitos primários, nos quais se incluem os carboidratos, proteínas e lipídeos, que são essenciais para as funções vitais da planta (Poser & Mentz, 2007). Os metabólitos secundários são substâncias de baixo peso molecular, de estrutura complexa e marcante atividade biológica, sendo utilizados no tratamento de diversas alterações orgânicas como diarreia, hipertensão arterial, reumatismo, hemorragias, problemas renais e do sistema urinário e processos inflamatórios (Taiz & Zeiger, 1991). Contrariamente aos metabólitos primários, são encontrados em concentrações relativamente baixas e somente em determinados grupos de plantas (Poser & Mentz, 2007).

Atualmente são conhecidos 140.000 metabólitos secundários que apresentam diversidade de estrutura química e grupamentos funcionais. De acordo com a estrutura e/ou origem biogênica, os metabólitos secundários podem ser divididos em diferentes grupos, tais como: esteróides, alcalóides, flavonóides, terpenos, taninos, cumarinas, ligninas, etc (Phillipson, 1999; Strohl, 2000; Verpoorte, 2000). Assim sendo, o reino vegetal representa uma grande fonte para a investigação de novas moléculas e terapias, considerando que dentre as 250.000 espécies conhecidas somente uma pequena porcentagem (8 a 12%) foi investigada sob o ponto de vista químico e, ainda, uma menor fração foi submetida a ensaios de atividade biológica (Williamson *et al.*, 1996).

O uso indiscriminado de plantas sem qualquer conhecimento fitoquímico, farmacológico e, principalmente, toxicológico é de grande preocupação para a saúde. Isso acontece com a maioria das espécies vegetais consumidas pela população. A determinação botânica correta da planta, sua forma de uso, posologia e controle da qualidade também constituem questões a serem estudadas (Billeter *et al.*, 1990; Redzic *et al.*, 2005).

2.7 O uso de fitoterápicos na Odontologia

Os fitoterápicos são muito utilizados nos cuidados gerais de saúde, sendo que muitas propriedades das espécies de valor na medicina podem ser utilizadas na Odontologia, indicadas principalmente para o uso em processos infecciosos, inflamatórios, no tratamento da dor e na cicatrização. Os meios mais comuns de preparo são a decocção, a maceração e a infusão (Lima Jr. *et al.*, 2005).

Na clínica odontológica, os pacientes relatam utilizar bochechos de plantas medicinais na forma de infusão no pós-cirúrgico, com o objetivo de minimizar o edema. A infusão obtida da sálvia (*Salvia officinalis* L.) apresenta atividade antioxidante e antimicrobiana. A *Calendula officinalis* L. é empregada na cicatrização de feridas, com ação anti-inflamatória e antibacteriana (Oliveira *et al.*, 2007).

Inúmeros estudos avaliaram *in vitro* e *in vivo* a atividade anti-inflamatória, antimicrobiana, cicatrizante, antiviral, antifúngica, anestésica e antioxidante, a partir de diversos extratos e óleos vegetais como: aroeira, romã, tanchagem, óleo de copaíba, jambolão, sálvia, arnica, calêndula, hamamelis, anis-estrelado, melissa, ficus, algodoeiro-arbóreo, alecrim, capim-limão e acácia-mimososa, confirmando as propriedades das mesmas (Iauk *et al.*, 2003; Pereira *et al.*, 2005; Drumond *et al.*, 2006; Silva *et al.*, 2006; Soares *et al.*, 2006; Zanin *et al.*, 2007).

2.8 Características da espécie vegetal - *Ipomoea batatas* (L.) Lam.

A batata-doce (*Ipomoea batatas* (L.) Lam.) é uma dicotiledônea da família Convolvulaceae, originária da América tropical, tendo como provável centro de diversidade o noroeste da América do Sul. Devido a sua natureza rústica, ampla adaptabilidade e facilidade de multiplicação, disseminou-se por toda a Ásia, África e América Latina durante os séculos XVII e XVIII. Atualmente, os únicos países industrializados que produzem quantidades apreciáveis de batata-doce (cerca de 50.000 toneladas) são, respectivamente, o Japão e os Estados Unidos (Cip, 2010).

O Brasil ocupa o décimo lugar na produção de batata-doce. Sua quantidade produzida é em torno de 498.046 toneladas/ano, com área plantada de 43.959 hectares e sua

produtividade média é de 11.542 kg/hectare (Silva *et al.*, 2004). A batata-doce é a quarta hortaliça mais consumida pela população brasileira, com média de 3,6 kg/hab/ano, superada apenas pela batata, tomate e abóbora (Cardoso *et al.*, 2005). As ramas e raízes tuberosas são largamente utilizadas na alimentação humana, animal e também como matéria-prima nas indústrias de alimento, tecido, papel, cosmético, preparação de adesivos e álcool carburante (Cip, 2010).

A alta capacidade de produção por área, aliada ao cultivo relativamente simples e pouco dispendioso, torna-a uma hortaliça muito popular e bastante consumida. A batata-doce exige temperaturas relativamente altas e não tolera geadas. Para seu desenvolvimento vegetativo adequado a planta exige temperatura média superior a 24°C, alta luminosidade, fotoperíodo longo e suficiente umidade do solo. Sendo assim, a região sul do Brasil é a maior produtora de batata-doce, com cerca de 251.219 toneladas/ano, seguida da região Nordeste, com produção média de 158.474 toneladas/ano (Cardoso *et al.*, 2005).

Na alimentação humana, as raízes tuberosas podem ser utilizadas in natura, cozidas, fritas e assadas, bem como utilizadas para produção de doces, biscoitos e bolos, podendo ainda ser industrializadas e utilizadas para produção de farinhas, féculas, açúcares e xaropes. Devido ao elevado teor protéico (23 a 25% em massa seca) e nutritivo das folhas e pecíolos frescos, estes também são consumidos como qualquer outra hortaliça de folha em saladas ou cozidos com bons resultados (Chang *et al.*, 2007).

A batata-doce é uma planta de excelente fonte de nutrientes e especialmente, fonte de energia, devido à concentração de carboidratos, açúcares, sais minerais, vitaminas A, C e do Complexo B. Além disso, contém também grande quantidade de metionina, que é um dos aminoácidos essenciais para o bem estar dos seres humanos (Cardoso *et al.*, 2005).

2.9 Atividade fisiológica da batata-doce

A planta da batata-doce possui altos níveis de polifenóis, entre eles, as antocianinas e os ácidos fenólicos (cafeico, mono, di e tricafeoalquínico). Estes compostos foram identificados como responsáveis pela sua atividade fisiológica (Konczak-Islam *et al.*, 2003).

Estudos recentes demonstraram que a batata-doce de cor branca apresenta atividade antidiabética, tendo o seu componente ativo (uma glicoproteína não definida), sido isolado do córtex da raiz (Kusano *et al.*, 2001). A prevenção do desenvolvimento de carcinomas coloretais pode ser feita através do consumo de antocianinas provenientes da batata-doce de cor roxa, este fato foi verificado através de um estudo realizado em ratos, aos quais foram inicialmente administrados 1,2-dimetilhidrazina (DMH) e 2-amino-1metil-6-fenilimidazol[4,5]piridina (PhIP), ambos os compostos indutores de carcinomas, tendo estes sido posteriormente sujeitos a uma dieta em 5% rica em antocianinas de batata-doce de cor roxa, verificado-se uma inibição dos adenomas e carcinomas (Hagiwara *et al.*, 2002). Da mesma forma, a alimentação de ratos que possuíam lesões do fígado, induzidas com tetracloreto de carbono, com um extrato de antocianinas isoladas da batata-doce, provocava uma redução nas lesões (Suda *et al.*, 1997).

Investigadores caracterizaram e identificaram agentes anti-mutagênicos extraídos de folhas da planta da batata-doce. A análise espectroscópica sugere que o agente anti-mutagênico isolado possa ser uma glicoproteína 13 presente nesta espécie de planta (Zheng & Clifford, 2008).

As fibras de batata-doce ajudam na cicatrização de feridas através da absorção de exsudato e tecido necrótico em lesões provocadas na pele de ratos, sugerindo que, em combinação com outras drogas, esta fibra poderia ser usada como um produto na terapia de lesões da pele (Suzuki *et al.*, 1996).

Um efeito neuroprotetor da batata-doce roxa foi observado, em camundongos, a partir da inibição da expressão das citocinas pró-inflamatórias interleucina - 1 β (IL-1 β), interleucina - 6 (IL-6) e fator de necrose tumoral - α (TNF- α) induzidas pela injeção de lipopolissacarídeo (LPS) bacteriano. Considerando o baixo índice de efeitos colaterais no organismo, a batata poderia funcionar como uma nova estratégia terapêutica no tratamento de doenças inflamatórias cerebrais (Wang *et al.*, 2010).

No entanto, pouco se sabe sobre a viabilidade do uso dessa espécie na Odontologia, sendo de extrema importância para a saúde humana o desenvolvimento de pesquisa nesta

área, a fim de avaliar os mecanismos de ação e efeitos adversos que esta planta poderia provocar na cavidade bucal.

3 PROPOSIÇÃO

Os objetivos dessa pesquisa foram:

Extrato bruto hidroalcoólico de batata-doce (EBHBD):

- Determinar e quantificar os componentes;
- Avaliar atividade antioxidante (método fosfomolibdênio);
- Avaliar atividade anti-inflamatória (edema de orelha);

Gel contendo EBHBD:

- Determinar a fórmula farmacêutica em hidroxietilcelulose;
- Determinar o potencial anti-inflamatório (edema de pata em ratos);
- Avaliar atividade antioxidante (método fosfomolibdênio);
- Determinar a concentração inibitória mínima (CIM) em cinco cepas: *Staphylococcus aureus* ATTC 25923, *Escherichia coli* ATCC 25922, *Candida albicans* ATCC 10231, *Streptococcus mutans* ATCC 25175, *Streptococcus mitis* ATCC 903;
- Verificar a atividade anti-inflamatória a partir da liberação de citocinas fator de necrose tumoral alfa (TNF- α) e interleucina 1 beta (IL-1 β) em cultura de células de fibroblastos gengivais de humanos;
- Verificar a toxicidade (teste do brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio - MTT e *Artemia salina*);
- Observar em um estudo clínico aleatorizado, o efeito sobre o biofilme dental e inflamação gengival por meio de parâmetros clínicos e microbiológicos.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Colheita e processamento do material vegetal

Para padronização e manutenção da qualidade do material vegetal utilizado no estudo, optou-se por realizar desde a colheita das folhas até a obtenção final do extrato. Desta forma, as folhas de batata-doce foram coletadas no Colégio Agrícola da Universidade Estadual de Ponta Grossa – UEPG, Paraná, nos meses de Setembro e Outubro de 2008, durante o dia. Seu registro está depositado no Herbário da UEPG (HUPG) com o número 17.033. As folhas foram secas em temperatura ambiente durante 10 dias e, com o material seco, realizou-se a pulverização em moinho de facas e, após a tamisação, obtivemos um material com granulometria de 500 μm .

4.2 Determinação do conteúdo de umidade residual

Para esta determinação empregou-se o método de dessecação, partindo de 4 g de amostra exatamente pesada em uma placa de Petri previamente pesada. A amostra foi aquecida a 100°C durante três dias e, após esse período, foi pesada novamente. O valor obtido na diferença entre as pesagens foi considerado como o teor de umidade das folhas de batata-doce. O teste foi realizado em triplicata. O teor de umidade residual ficou em torno de 19,5%. Portanto, como o extrato foi padronizado em uma concentração de 20%, utilizamos como solvente álcool 74%.

4.3 Extração por maceração

A maceração é um método de extração muito utilizado que consiste em manter a planta com uma quantidade de solvente pré-estabelecida, à temperatura ambiente, em recipiente fechado, durante 2 a 14 dias. É um processo não seletivo que resulta num equilíbrio de concentração entre a droga e o solvente, e é influenciado por fatores que dependem da droga (sua natureza, tamanho de partícula, grau de umidade e quantidade em peso), e do solvente (sua seletividade e quantidade em volume). A velocidade com que se obtém o equilíbrio é função do tamanho de partícula e do grau de inchamento das células, bem como da viscosidade e da polaridade do solvente (Farmacopéia Brasileira IV, 1988).

Na maceração realizada neste estudo, foram utilizadas amostras com peso de 20,0 g e com volume de 100 mL de etanol 74% (v/v), em frascos de erlenmeyer de 250 mL. Uma vez fechado o recipiente com o macerado, deixou-se sob agitação mecânica constante (maceração dinâmica) durante sete dias. A maceração transcorreu à temperatura ambiente e ao término do tempo o extrato foi filtrado através de um funil normal com papel de filtro e concentrado à secura.

4.4 Testes fitoquímicos

Considerando que o número de informações fitoquímicas relacionadas a folha da batata-doce são extremamente limitados, realizaram-se testes fitoquímicos preliminares a fim de detectar algumas classes de constituintes químicos, dentre eles, heterosídeos flavonóidicos, alcalóides, heterosídeos antraquinônicos, cumarinas, taninos e heterosídeos saponínicos.

Para a realização dos testes fitoquímicos, fez-se primeiramente o fracionamento, pois reações diretamente caracterizadas no extrato bruto podem mascarar o resultado, e os testes feitos com as frações possibilitam reações mais nítidas. Foram realizados três fracionamentos, sendo que o primeiro líquido extrator é o mais apolar, o n-hexano (F1). Foram realizadas 5 extrações com o mesmo solvente, utilizando 40 mL em cada vez, totalizando 200 mL de n-hexano. O líquido extrator foi acrescentado ao EBHBD no funil de separação. Foram formadas duas fases bem distintas, aquela que foi a fase do solvente foi recolhida em frasco e armazenada. A cada etapa do fracionamento, após a extração, o volume do extrato restante foi levado ao banho-maria (60°C) para que houvesse a evaporação total do solvente extrator.

O segundo fracionamento foi realizado com diclorometano (F2). O procedimento foi o mesmo de F1, utilizando o mesmo funil de separação. No terceiro fracionamento foi utilizado um solvente mais polar, o acetato de etila (F3) com a mesma técnica já descrita. O último fracionamento foi com etanol 74% (F4). Nesta etapa final, após a evaporação do solvente F3, foi acrescentado ao restante do extrato, submetido ao fracionamento, etanol 74% até completar o volume de 200 mL, para originar o F4, sem a utilização do funil de separação (Nakashima, 1993).

4.5 Ensaio fitoquímicos

A partir das frações do EBHBD foram realizadas as seguintes pesquisas:

4.5.1 Pesquisa de flavonóides

- a) Reação de Shinoda: foram evaporados à secura em cápsulas no banho-maria, 10 mL das frações e o resíduo foi dissolvido em 5 mL de etanol 70%. As frações ressuspensas foram transferidas para tubos de ensaio e foram adicionados em cada tubo 100 mg de limalha de magnésio. Os tubos foram imersos no gelo (“banho de gelo”) e lentamente foi adicionado 1 mL de ácido clorídrico concentrado. A reação positiva ocorre pelo desenvolvimento de coloração rósea a vermelho.
- b) Reação com zinco: foram evaporados à secura em cápsulas no banho-maria, 10 mL das frações e o resíduo foi dissolvido em 5 mL de etanol 70%. As frações ressuspensas foram transferidas para tubos de ensaio e foram adicionados em cada tubo uma pastilha de zinco. Os tubos foram imersos no gelo (“banho de gelo”) e lentamente foi adicionado 1 mL de ácido clorídrico concentrado. A reação positiva se caracteriza pelo desenvolvimento de coloração.
- c) Reação oxalo-bórica: foram evaporados à secura em cápsulas no banho-maria, 10 mL das frações e o resíduo foi dissolvido em 0,5 mL de acetona com 30 mg da mistura ácido oxálico:ácido bórico (1:1). A solução, ainda nas cápsulas, foi agitada lentamente e levada ao banho-maria para evaporar à secura. A reação foi observada na câmara de ultravioleta, sob o comprimento de onda de 365 nm. O desenvolvimento de fluorescência nas cores amarelo-esverdeada e azul esverdeado, após alguns minutos, indica reação positiva.
- d) Reação de Pacheco: foram evaporados à secura, em cápsulas no banho-maria, 10 mL das frações. Foram acrescentados nas cápsulas alguns cristais de acetato de sódio com 0,2 mL de anidrido acético e a

solução foi levada ao fogareiro à ebulição. A seguir, 0,2 mL de ácido clorídrico foi adicionado em cada fração. O desenvolvimento de coloração roxa indica a presença de grupos dihidroflavonóides.

4.5.2 Pesquisa de Alcalóides

Foram evaporadas à secura, em cápsulas no banho-maria, 30 mL frações 1 a 3. Ao resíduo, foram acrescentados 0,5 mL de etanol 70% e 10 mL de ácido clorídrico 1%. Um mL de cada fração foi distribuído em 5 tubos de ensaio, sendo que um deles serviu como o branco da reação. Em cada tubo foi adicionado algumas gotas de um reagente: Mayer, Bertrand, Bouchardat e Dragendorff. A formação de precipitado indica reação positiva.

Na fração 4, foram levados 30 mL, em cápsula, ao banho-maria até reduzir o volume (1/3). Após esfriar, foi adicionado 10 mL de ácido clorídrico 1% até o pH ficar ácido e depois o meio foi alcalinizado com hidróxido de amônio, até pH 10. O volume foi transferido para um funil de separação, no qual adicionou-se 20 mL de éter:clorofórmio (3:1). A fase etérea da separação foi transferida para outro funil de separação, no qual foi acrescentado 10 mL de ácido clorídrico 1%. Com a fase ácida da separação foi realizado o mesmo processo já descrito, utilizando os reagentes nos tubos de ensaio. Esse processo foi feito para purificação do material e melhor verificação dos resultados.

4.5.3 Pesquisa de Antraquinonas (Reação de Borntrager)

Vinte mililitros das frações 1 a 3, em cápsulas, foram reduzidos à 5 mL no banho-maria e transferidos para um tubo de ensaio, ao qual foi adicionado 1 mL de hidróxido de amônio. A solução foi agitada e a formação de coloração avermelhada caracteriza a presença desse metabólito.

4.5.4 Pesquisa de Cumarinas

Foram evaporadas à secura, em cápsulas no banho-maria, 10 mL das frações 1 a 3, e depois ressuspensas em 5 mL de éter. Para cada fração foi utilizado um pedaço de papel de filtro. Foram marcados três pontos e, neles foram adicionadas cinco gotas do extrato, uma após a secagem da outra. Uma solução de hidróxido de sódio foi preparada com uma lentilha e 1 mL de água destilada. Uma gota desta solução foi acrescentada em 2 dos 3

pontos do papel com o extrato. Um ponto com este reativo foi coberto com papel alumínio e então o papel de filtro foi levado à câmara de ultravioleta (365 nm) para se observar o desenvolvimento de fluorescência, após cerca de 5 minutos (resultado positivo). O ponto coberto foi apenas para comparação após a leitura.

O processo com a fração 4 foi o mesmo, mas antes de evaporar no banho-maria foram adicionados nos 10 mL da fração, 5 mL de ácido clorídrico 2N para acidificar o meio até pH 1,0. Então, o volume foi reduzido e a fase etérea foi separada para a realização do teste.

4.5.5 Pesquisa de Taninos

Foi realizada apenas com a fração 4.

- a) Cloreto férrico 1%: em 1 mL do extrato, em um tubo de ensaio, foi adicionada 1 gota do reativo. A presença de coloração indica reação positiva.
- b) Sulfato de ferro amoniacal 5%: em 1 mL do extrato, em um tubo de ensaio, foi adicionada 1 gota do reativo. A presença de coloração indica reação positiva.
- c) Reação com gelatina 2,5%: foram utilizados 3 tubos de ensaio (0,1; 0,5 e 1 mL) com o extrato. Foram acrescentados 2 mL da solução de gelatina em todos os tubos. A presença de precipitação caracteriza reação positiva.
- d) Ácido nitroso: em uma cápsula com 5 mL do extrato foram adicionados cristais de nitrito de potássio e cinco gotas de ácido sulfúrico 0,5%. O desenvolvimento de coloração rósea caracteriza um resultado positivo.

4.5.6 Pesquisa de Saponinas

Esta pesquisa foi realizada com as frações 3 e 4. Dez mililitros de cada fração foram evaporadas à secura, em cápsulas no banho-maria e ressuspensas em 10 e 5 mL de água destilada, respectivamente. Cada fração foi dividida em três tubos de ensaio. Em um tubo permaneceu apenas a fração (branco), em outro foram adicionadas gotas de ácido clorídrico até pH ácido e no último tubo foram adicionadas gotas de hidróxido de sódio até

pH básico. Os tubos foram agitados vigorosamente. A formação de espuma indica a presença de saponinas.

4.5.7 Quantificação dos metabólitos secundários

4.5.7.1 Fenólicos totais

Para extração dos fenólicos totais, 5 g do pó da folha de batata-doce foram misturados com 80 mL de metanol e mantido *overnight*. A suspensão foi filtrada com filtro *Whatman* n°1 e o filtrado foi diluído para 100 mL de metanol. As amostras foram armazenadas à 4°C e serviu como solução estoque (50 mg/mL).

O conteúdo total de fenólicos no EBHBD foi determinado pelo método colorimétrico de Folin-Ciocalteu (Singleton *et al.*, 1999). Duzentos µL da solução estoque foram misturados com 1,4 mL de água destilada e 100 µL do reagente Folin-Ciocalteu. Após esperar no mínimo 30 segundos (não ultrapassando 8 minutos), foram adicionado 300 µL de Na₂CO₃ 20% à amostra. A absorbância foi medida a 740 nm depois de 2 horas de incubação no escuro à temperatura ambiente. A solução padrão de ácido gálico (10-100 ppm) foi feita da mesma maneira para preparar a curva de calibração. Os resultados foram expressos como miligrama de equivalente de ácido gálico por 100 g de extrato seco (EAG)/100g. O teste foi realizado em triplicata.

4.5.7.2 Alcalóides

A quantidade de alcalóides foi determinada em triplicata, por extração líquido-líquido e análise gravimétrica. A fração clorofórmica (20 mL) foi fracionada sucessivamente com HCl 1, 0,5 e 0,25 mol L⁻¹. A fase aquosa foi coletada, alcalinizada com NH₄OH₆ mol.L⁻¹ e fracionada com clorofórmio. Esta fase orgânica foi então evaporada à secura em banho-maria (60°C), em uma cápsula de porcelana previamente calibrada. Para a fração hidroetanólica (20 mL), também foi realizada a alcalinização com NH₄OH₆ mol.L⁻¹, partição com clorofórmio e evaporação até a secura. A massa de resíduo sólido das frações clorofórmica e hidroetanólica foi determinada com precisão. A quantidade total de alcalóide, incluindo base livre e forma de sal foi expressa em miligramas de alcalóides por 100 g de amostra seca.

4.5.7.3 Antraquinonas

A quantidade de antraquinonas foi determinada espectrofotometricamente em triplicata, depois de um pré-tratamento adequado. Um volume de 0,5 mL da fração acetato de etila foi alcalinizado com 50 mg de NaHCO₃ e oxidado com uma solução aquosa de FeCl₃ à 10,5% (20 mL). A mistura foi fervida sob refluxo por 5 min. Depois, acrescentou-se 1 mL de HCl concentrado e a reação foi mantida na mesma condição durante 20 min. Em temperatura ambiente, a mistura foi fracionada com éter etílico por três vezes. A fase etérea foi transferida para um balão aferido de 100 mL e o volume final foi completado com este solvente orgânico para obter a solução estoque. Em seguida, 10 mL dessa solução foi evaporada à secura em banho-maria (60°C). O resíduo sólido foi dissolvido em 10 mL de acetato de magnésio 0,5% em solução de metanol. A absorbância foi analisada em 515 nm com o espectrofotômetro UV-Vis. O mesmo procedimento de análise foi realizado para a fração hidroetanólica. Soluções-padrão de 1,8-dihidroxi-antraquinona (0,005-0,06 mg mL⁻¹) em éter foram similarmente evaporados e tratados com acetato de magnésio 0,5% em metanol para obter a curva analítica. O metanol foi usado como branco. Os resultados foram expressos em miligramas de derivados de hidroxiantraquinona por 100 g de amostra seca.

4.6 Avaliação das atividades biológicas do EBHBD

Alguns aspectos devem ser observados quando se procura princípios ativos em plantas. Neste contexto, devem ser levados em consideração a simplicidade, a rapidez, a reprodutibilidade e o baixo custo dos testes biológicos (Bashir *et al.*, 1991). Usualmente, são feitas triagens com modelos experimentais menos complexos e após a seleção das substâncias puras ativas, estas são avaliadas em ensaios mais específicos, e posteriormente submetidas à análise do mecanismo de ação biológica. Alguns dos principais efeitos biológicos procurados em plantas e alguns dos modelos experimentais utilizados são, entre outros, a atividade antibacteriana (método de difusão em ágar e da concentração inibitória mínima), atividade antioxidante e atividade anti-inflamatória (edema de pata e orelha em camundongos e ratos) (Cechinel Filho & Yunes, 1998).

4.6.1 Atividade Antioxidante

As espécies reativas de oxigênio (ERO) são constituídas por moléculas energeticamente instáveis que adquirem estabilidade ao captar elétrons de moléculas vizinhas, isto é, oxidando-as. As capacidades pró-oxidante e antioxidante das células devem ser mantidas em equilíbrio a fim de se evitar o perigo potencial de estresse oxidativo. Quando ocorre aumento das ERO e/ou diminuição da capacidade, elas podem lesionar componentes celulares, inclusive o ácido desoxirribonucléico (DNA), modificando sua estrutura ou função e gerando estresse oxidativo. Isto pode explicar então a possível associação entre várias doenças e as ERO (Kahl, 1991).

As plantas são uma rica fonte de substâncias biologicamente ativas, muitas das quais apresentam atividade antioxidante. Os antioxidantes naturais podem ter uma ou mais das seguintes funções: captura de radicais livres, agentes redutores, complexantes de metais pró-oxidantes e extintores de radical oxigênio. As vitaminas E e C, assim como o β -caroteno, também capturam radicais de oxigênio; estes antioxidantes são compostos de origem natural, como também o são os flavonóides, ácidos fenólicos e os compostos de nitrogênio como os alcalóides e os derivados do cloreto de fenila (Kinsella *et al.*, 1993).

Assim, para avaliar esta possível importante atividade antioxidante do EBHBD utilizamos o método do fosfomolibdênio.

4.6.1.1 Método do fosfomolibdênio

O método de complexação pelo fosfomolibdênio para a determinação da capacidade antioxidante total é baseado na redução de molibdênio (Mo) (VI) a Mo (V) pela amostra analisada. Essa redução possibilita a formação de um complexo verde entre fosfato e molibdênio (V), em pH ácido, determinado espectrofotometricamente a 695 nm (Prieto *et al.*, 1999).

Uma alíquota de 0,3 mL da amostra em solução aquosa a $200 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$, foi acrescentada em um tubo de ensaio, juntamente com 3 mL do reativo (molibdato de amônio $4 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$, fosfato de sódio $28 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$, ácido sulfúrico $0,6 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$). Os tubos foram fechados hermeticamente e levados ao banho-maria a 95°C durante 90 minutos.

Os tubos foram resfriados e a leitura foi efetuada em espectrofotômetro UV-VIS a 695 nm contra um branco (0,3 mL de água acrescidos de 3,0 mL do reativo). O padrão utilizado foi o ácido ascórbico 200 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$.

4.6.2 Avaliação do edema de orelha

Para testar a atividade anti-inflamatória pré-clínica do EBHBD in vivo, optamos por realizar inicialmente o teste de edema de orelha (Protocolo Comissão de Ética em Pesquisa da Universidade Estadual de Ponta Grossa: n.192008). O edema de orelha foi expresso como o aumento da espessura da orelha dos camundongos (μm) (Hecker & Schmidt, 1974). A espessura da orelha foi medida próxima à extremidade medial da mesma, com o auxílio de um micrômetro digital (GREAT MT – 045B), antes e após determinado tempo da indução do processo inflamatório. O EBHBD e o agente flogístico foram dissolvidos em 20 μL de acetona e aplicados na orelha direita de camundongos.

4.6.2.1 Edema de orelha induzido pela aplicação tópica do TPA

O TPA é um éster de forbol presente no óleo de cróton (*Cróton tiglium* L.), sendo um potente agente flogístico e promotor de tumor capaz de promover uma resposta inflamatória e hiperproliferativa bastante intensa, assemelhando-se com algumas doenças cutâneas. Esse modelo de inflamação cutânea aguda permite identificar inibidores da biossíntese das prostaglandinas e leucotrienos, assim é amplamente utilizado na triagem de compostos que pertencem à classe dos inibidores da cicloxigenase e/ou lipoxigenase, bem como compostos com atividade corticóide (Gàbor, 2003).

Para avaliar a atividade do EBHBD nesse modelo, o edema de orelha foi induzido pela aplicação tópica de 2,5 μg orelha de TPA, dissolvido em 20 μL de acetona. Vinte e quatro camundongos Swiss machos (30 g) foram divididos em seis grupos ($n = 4$). O EBHBD (0,1; 0,3; 0,6 e 1,0 mg/orelha bem como o controle positivo dexametasona (0,05 mg/orelha), foram aplicados topicamente logo após o tratamento com o TPA. No controle negativo foi aplicado apenas (TPA). A espessura da orelha foi avaliada 6 horas após a aplicação do TPA conforme descrito anteriormente (De Young *et al.*, 1989). Os animais envolvidos neste experimento não foram sacrificados, ficando a disposição no Biotério.

4.7 Manipulação da formulação em gel do EBHBD

Após a verificação da atividade anti-inflamatória prévia do EBHBD no edema de orelha, com o melhor efeito sendo observado na concentração de 1,0 mg/orelha (5%) (figura 9) necessitou-se observar se essa atividade se mantinha na formulação de gel, a qual seria utilizada na etapa clínica do projeto. Para isso definimos três concentrações de EBHBD a serem manipuladas e testadas novamente em animal.

Essa fase da pesquisa foi desenvolvida no Laboratório de Farmacotécnica do Departamento de Ciências Farmacêuticas da UEPG, utilizando técnicas de desinfecção e anti-sepsia preconizadas à manipulação farmacêutica (Pelczar *et al.*, 1996; Thompson, 1998). A princípio, o EBHBD seria formulado em gel orabase, porém, observou-se que o mesmo não dispersou nesse veículo. Desta forma, o EBHBD, a clorexidina e o placebo foram manipulados em gel aquoso do polímero não-iônico hidroxietilcelulose de uso oral (Natrosol®- PharmaSpecial®, São Paulo, Brasil) a 3% (m/m), utilizando a técnica geral de incorporação de ativos em bases galênicas, conforme as formulações preconizadas na literatura (Appel & Reus, 2005; Ferreira & Brandão, 2008).

Para cada substância promoveu-se a pesagem com exatidão, em função da concentração (Quadro 1). Em seguida, tanto o EBHBD quanto o digluconato de clorexidina foram dispersados em propilenoglicol. Posteriormente, gradativamente, acrescentou-se o gel base de hidroxietilcelulose (HEC), adicionando-se, em seguida, a essência de cereja, como flavorizante e 1% de solução corante marrom. Complementarmente, manipulou-se um gel controle (placebo), contendo apenas 0,5% de essência de cereja, 5% de propilenoglicol, 1% de solução corante marrom em gel base de HEC a 3% (m/m).

4.7.1 Controle da qualidade das formulações farmacêuticas

Após a manipulação da formulação farmacêutica em gel, foi realizado o controle de qualidade dos géis utilizados por meio da determinação do pH, densidade absoluta, consistência e avaliação microbiológica.

4.7.1.1 Determinação dos valores de pH

Os valores do pH foram obtidos em triplicata com um potenciômetro digital

DMPH-2 (Digimed®, São Paulo, Brasil) previamente calibrado (Farmacopéia Brasileira IV, 1988). Considerando os valores obtidos nessa determinação, as formulações foram ajustadas para um valor de pH de 6,50 com uma solução de hidróxido de sódio a 20% (m/V).

4.7.1.2 Determinação da densidade absoluta

A determinação da densidade relativa foi feita utilizando o método do picnômetro (triplicata) (Farmacopéia Brasileira IV, 1988).

4.7.1.3 Determinação da consistência

A consistência foi estabelecida por meio do escoamento. A massa de 1,0 g de cada formulação foi depositada sobre uma placa de vidro. Uma segunda placa (750 g) foi colocada de forma paralela sobre a primeira. Após 5 minutos, o diâmetro do halo resultante da aplicação da força foi mensurado com régua graduada em milímetros (Laufer Neto *et al.*, 2006).

4.7.1.4 Avaliação microbiológica

Para esta análise foi utilizado o kit Newplus I (Newprov®, Pinhais – Brasil). Os géis foram transferidos, para o caldo Letheen (9,0 mL), para inativar o sistema conservante. Em seguida, foi adicionado 0,5 mL da suspensão e colocado nos meios Ágar Letheen, Mac Conkey e Sabouraud dextrose. As placas contendo os meios Ágar Letheen e Mac Conkey foram incubadas em estufa ($35 \pm 0,5$ °C), por 24 e 48 h. As placas com o meio Ágar Sabouraud dextrose foram mantidas em temperatura ambiente por 10 dias. Após os períodos determinados, foi avaliado o crescimento bacteriano e fúngico (Pinto *et al.*, 2003).

4.7.2 Edema de pata induzido por LPS

Com o objetivo de testar a eficácia do EBHBD na formulação de gel optou-se pelo modelo de edema de pata em ratos, pois esta formulação não permitiu a realização do teste em edema de orelha (Protocolo Comissão de Ética em Pesquisa: 06497/08). Um total de 16 ratos Wistar machos (180 a 260 g) foram divididos em 4 grupos (n =4), sendo que o edema de pata foi induzido pela injeção de 0,1 mL (100 µg) de lipopolissacarídeo (LPS) na

região subplantar da pata direita, a pata esquerda foi mantida como controle. Os animais foram tratados com a administração tópica de diferentes concentrações de gel contendo EBHBD (1, 5 e 10%). O edema da pata foi avaliado após 1 e 2 horas da aplicação do LPS, sendo expresso como o aumento da sua espessura, avaliado com o auxílio de um micrômetro digital (GREAT MT – 045B). Os animais envolvidos neste experimento não foram sacrificados, ficando a disposição no Biotério.

4.7.3 Atividade antioxidante total do gel

Assim como para o EBHBD, realizou-se o teste de atividade antioxidante total para o gel como já descrito anteriormente. Uma alíquota de 5 g do gel de hidroxietilcelulose contendo 10% de EBHBD, quantidades que equivalem a $200 \mu\text{g.mL}^{-1}$ de princípios ativos, foi adicionada a 3 mL do reativo (molibdato de amônio 4 mmol.L^{-1} , fosfato de sódio 28 mmol.L^{-1} , ácido sulfúrico $0,6 \text{ mol.L}^{-1}$) em tubos de ensaio. Os tubos foram fechados hermeticamente e levados ao banho-maria a 95°C durante 90 minutos.

Os tubos foram resfriados e a leitura foi efetuada em espectrofotômetro UV-VIS a 695 nm contra um branco (0,3 mL de água acrescidos de 3,0 mL do reativo). O padrão utilizado foi o ácido ascórbico $200 \mu\text{g.mL}^{-1}$.

4.7.4 Determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM) do gel contendo EBHBD

Cinco cepas de microrganismos foram usadas no controle de sensibilidade dos ensaios: *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Escherichia coli* ATCC 25922, *Candida albicans* ATCC 10231, *Streptococcus mutans* ATCC 25175, *Streptococcus mitis* ATCC 903.

Os ensaios de sensibilidade de microdiluição em caldo foram feitos em triplicata (Necls, 2003). Os testes foram realizados em caldo Mueller-Hinton contido em microplacas de 96 poços. Os géis contendo EBHBD e clorexidina foram depositados nos poços, seguindo a técnica de diluição em série, na escala de 0,78125 a 100 mg/mL e 0,078125 a 10 mg/mL, respectivamente. Foi realizado controle do gel contendo EBHBD e clorexidina, do caldo Mueller-Hinton e dos microrganismos. As placas foram incubadas a 35°C durante 24

h. A leitura foi realizada através da mudança de cor da solução reveladora (cloreto de 2,3,5 – trifenil tetrazólio), considerando o resultado positivo a ausência de coloração e negativo na presença de coloração rosa-avermelhada.

4.7.5 Cultura de fibroblastos de gengiva de humanos

O material para o cultivo celular foi obtido de gengiva humana. Foi selecionado um indivíduo, sexo masculino, não fumante, 22 anos, cuja anamnese revelou estado sistêmico normal. O indivíduo não relatou o uso de qualquer tipo de medicamento. O voluntário foi submetido a uma biópsia de aproximadamente 20mm² (4x5mm) de mucosa ceratinizada (epitélio e tecido conjuntivo) da região retromolar. Foi indicado um procedimento periodontal cirúrgico de cunha distal neste sítio doador, de modo a favorecer a higienização do indivíduo. Antes da realização da cirurgia, o indivíduo foi informado sobre o projeto e optou por participar do mesmo por livre e espontânea vontade, com consentimento informado (Protocolo n.0649708 – Comissão de Ética em Pesquisa em Humanos da Universidade Estadual de Ponta Grossa) (ANEXO 1). Após coleta da amostra, a mesma foi lavada em soro fisiológico, colocada em uma garrafa de cultura de 25cm² contendo meio Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM) (Sigma, Sigma Chemical CO, EUA), suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB) (Gibco, Gibco Industries Inc., EUA) e 1% de antibióticos e antifúngico (PSA).

No protocolo de cultura utilizado, a biópsia de 20 mm² foi lavada por 2 vezes com solução salina de fosfato tamponada (PBS) e, posteriormente, o tecido epitelial foi removido (Kuru *et al.*, 1998). Então a amostra foi dividida em 15 partes (fragmentos) de aproximadamente 1mm² e colocadas em garrafas de cultura de 25cm², com 2 mL do meio de cultura devidamente suplementado, em estufa a 37°C e 5% de CO₂ para aderência dos fragmentos ao substrato. O crescimento celular foi observado diariamente, através de um microscópio de fase invertida (40x a 200x, Olympus, Japão). Na 6^a passagem, as amostras celulares foram removidas das garrafas de cultura para análise da liberação de citocinas e viabilidade celular.

4.7.6 Efeito do tratamento do gel contendo EBHBD sobre a liberação de fator de necrose tumoral alfa (TNF- α) e interleucina 1 beta (IL-1 β) induzidas por lipopolissacarídeo (LPS) em fibroblastos gengivais *in vitro*

Os fibroblastos gengivais obtidos da cultura celular descrita anteriormente foram distribuídos em placas de cultura de 96 poços (4×10^4 células/poço) e incubadas para aderência por 24 h, 37°C, 5% de CO₂. Após lavagem das células com meio de cultura, lipopolissacarídeo bacteriano (LPS) foi adicionado às monocamadas nas concentrações de 0,001; 0,1 e 10 $\mu\text{g/mL}$ e o sobrenadante foi coletado 24 h após a adição do LPS para a avaliação dos níveis de TNF- α e IL-1 β por ELISA. Selecionada a dose de LPS (10 $\mu\text{g/mL}$), fibroblastos aderidos (mesmas condições anteriores) foram tratados com gel contendo EBHBD (0,1; 1; 10 e 30 $\mu\text{g/mL}$) 30 min antes da adição de LPS. Todos os tratamentos foram feitos pelo menos em sextuplicatas. Após a retirada das amostras, foi acrescentado o corante brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio (MTT) para avaliação da viabilidade das células conforme descrito adiante.

4.7.6.1 Dosagem de TNF- α e IL-1 β

Os níveis de TNF- α e IL-1 β foram avaliados no sobrenadante de monocamadas de fibroblastos por ELISA. Para este teste utilizamos uma placa de 96 poços, a qual foi coberta com 100 μL /poço com anticorpo de captura para TNF- α ou IL-1 β (1 $\mu\text{g/mL}$, R&D Systems) e deixada à temperatura ambiente por 24 horas. No dia seguinte, a placa foi lavada três vezes com tampão de lavagem apropriado e então foi adicionado a cada poço 300 μL /poço de tampão de bloqueio. A placa foi então incubada com este tampão por 1h à temperatura ambiente para bloqueio de sítios de ligação inespecíficos. Após este procedimento, a placa foi novamente lavada e, acrescentou-se 100 μL /poço das amostras (gel contendo EBHBD) e soluções padrão diluídas em 7 concentrações (2000, 1000, 500, 250, 125, 62,5, 31,2 pg/mL). A placa foi então incubada à temperatura ambiente por 24 h. Após este período, a placa foi lavada como descrito anteriormente e então adicionou-se 100 μL /poço de anticorpo anti-TNF- α e anti- IL-1 β de detecção (biotinilado 50 $\mu\text{g/mL}$, R&D Systems) e a placa incubada à temperatura ambiente por mais 2 h. Em seguida a placa foi novamente

lavada, acrescentou-se solução de estreptoavidina 100µL/poço e a placa foi então incubada por 20 min. Após nova lavagem, 100 µl de solução para substrato da R&D Systems para ELISA foi adicionada. A placa foi mantida no escuro por aproximadamente 25 min para o desenvolvimento de cor e em seguida a reação colorimétrica foi parada através da adição de ácido sulfúrico (1M - 50µL/poço). A leitura foi feita em espectrofotômetro no comprimento de onda de 450 nm com filtro de correção de 540 ou 570 nm.

4.7.7 Testes de Toxicidade

4.7.7.1 Viabilidade celular pelo método MTT

Para avaliar a viabilidade celular, foi utilizada a análise colorimétrica com o corante MTT (brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio). Este corante na forma oxidada possui cor amarela na qual se torna reduzido e de coloração azulada em células ditas viáveis. Essa coloração é feita pelas mitocôndrias por desidrogenases mitocondriais (Tada *et al.*, 1986). Nas placas utilizadas nos estudos *in vitro*, ao término do experimento, após a retirada das amostras, adicionou-se 100µL de MTT (1mg/ml) e a placa foi novamente incubada. Após vinte e quatro horas a reação foi bloqueada com solução de dodecil sulfato de sódio (SDS) 10% acídica. Esperou-se novamente vinte e quatro horas para a realização da medida da absorbância no comprimento de onda de 570 nm. em espectrofotômetro (Spekol 1100-Zeiss).

4.7.7.2 Teste de toxicidade da *Artemia salina*

4.7.7.2.1 Diluição do EBHBD e géis

O EBHBD (30 mg) foi diluído em 3 mL de uma solução aquosa com *Tween* 80 a 5% em seguida em 12 mL de água salinizada (q.s.p. 15 mL). Para os géis (base e EBHBD a 10%) foram obtidos 300 mg e diluídos da mesma forma com realizado para o EBHBD. Assim foram obtidas concentrações finais de 100, 500 e 1000 µg/mL.

4.7.7.2.2 Solução salina para eclosão dos ovos de *Artemia salina*

Os ovos de *Artemia salina* (200 mg) foram cultivados em solução salina contendo 14,31 g de sal marinho sem iodo dissolvidos em 400 mL de água destilada. O pH final da

solução foi de 8 (Meyer *et al.*, 1982; Solis *et al.*, 1993; De Siqueira *et al.*, 2001).

4.7.7.2.3 Cultura da *Artemia salina*

Os ovos de *A. salina* foram incubados em um pequeno aquário contendo a solução salina descrita anteriormente. Estes foram mantidos sob iluminação artificial e temperatura de 28°C. O estado de saturação de oxigênio foi conseguido com auxílio de um bomba. Após 48 horas, as larvas atingiram o estágio de metanúplio do microcrustáceo, que é mais sensível ao tratamento. As larvas não foram alimentadas (Carballo *et al.*, 2002; Nascimento *et al.*, 2009).

4.7.7.2.4 Determinação da toxicidade sobre a *Artemia salina*

O bioensaio com *Artemia salina* consistiu em distribuir 10 larvas (n=10) em cada tubo ensaio com 5 mL da solução salina nas concentrações graduais acima descritas de acordo com cada grupo. O período de incubação foi de 24 horas com iluminação artificial a 28°C (Meyer *et al.*, 1982). No controle negativo não foi adicionada nenhuma substância e o sulfato de quinidina (100, 500 e 1000 µL) foi utilizado como controle positivo. Os testes foram realizados em triplicata.

4.8 Ensaio clínico

4.8.1 Seleção da amostra

Foram selecionados 30 indivíduos de ambos os gêneros, acadêmicos de diferentes cursos de graduação da Universidade Estadual de Ponta Grossa. Como critério de inclusão os voluntários deveriam ser maiores de 18 anos (entre 18 – 30 anos), possuir pelo menos 24 dentes e no mínimo 1 molar e 1 pré-molar por sextante, não apresentar periodontite (perda clínica de inserção ≥ 3 mm, profundidade de sondagem ≥ 4 mm com supuração e/ou sangramento à sondagem). Não foram selecionados gestantes, indivíduos com doenças periodontais agudas, com doenças sistêmicas associadas à doença periodontal, que fizeram uso de antibióticos nos últimos 6 meses, uso crônico de anti-inflamatórios, uso de medicamentos que promovem crescimento gengival, que foram submetidos a tratamento periodontal no último ano, portadores de aparelho ortodôntico, lesões cariosas extensas, coroas totais ou próteses fixas envolvendo molares e pré-molares.

4.8.2 Procedimentos clínicos – fase preliminar

Na metodologia aplicada nesse estudo houve a exclusão da ação mecânica da escovação nos dentes 15, 16, 35 e 36 a partir da utilização de moldeiras parciais de polivinilacetato. Portanto, os indivíduos incluídos no estudo foram submetidos à moldagens parciais nos dentes selecionados, para obtenção de modelos de gesso. Sobre os modelos parciais, confeccionou-se previamente uma placa de alívio com uma lâmina de polivinilacetato com 0,5mm de espessura (plastificador à vácuo). Esta placa recobriu toda a área dental, atingindo 2 mm além da margem gengival nas faces vestibular e lingual, com o objetivo de fornecer um espaço, para manter o gel em contato com os dentes e a gengiva (Figura 1A). Sobre esta placa de alívio foi confeccionada uma segunda moldeira de polivinilacetato com 2 mm de espessura para facilitar a aplicação das substâncias (Figura 1B) (Nogueira-Filho *et al.*, 2000; Pannuti *et al.*, 2003).

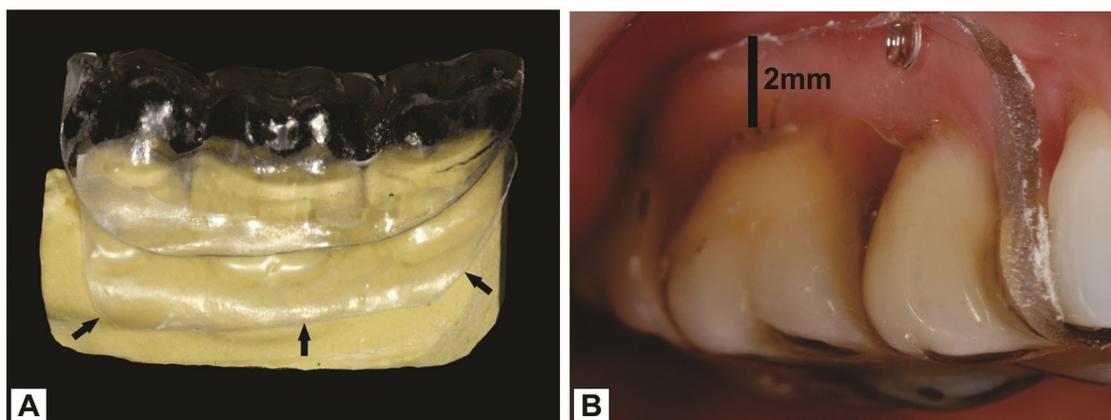


Figura 1. (A). Confeção da placa de alívio (Setas) com uma lâmina de polivinilacetato com 0,5mm de espessura para fornecer o espaço, para manter o gel em contato com os dentes e a gengiva. (B). Moldeira de polivinilacetato com 2 mm de espessura e extensão na margem gengival para aplicação das substâncias.

Nesta fase, os voluntários receberam dois procedimentos (um por semana) de profilaxia com jato de bicarbonato de sódio, com o objetivo de reduzir o biofilme dental.

Os participantes foram submetidos a 3 tratamentos em um modelo cruzado duplo cego (Figura 2): Tratamento 1- Gel do extrato hidroalcoólico bruto de batata-doce a 10%; Tratamento 2- Gel de clorexidina a 2% (controle positivo); Tratamento 3- placebo- gel de hidroxietilcelulose a 3%. O período de tratamento foi de 15 dias com um Washout (intervalo entre cada tratamento) de 10 dias (Nogueira-Filho *et al.*, 2000).

Os voluntários receberam um “kit” individual (Figura 3) contendo duas moldeiras parciais individuais (dentes 15,16 e 35,36) em um recipiente próprio para o acondicionamento, uma escova dental (Oral-B[®] Indicator[®] Plus – tamanho 30), um dentífrício (Colgate[®] Máxima Proteção Anticáries) e seringas descartáveis de 5mL contendo o gel a ser utilizado. Os indivíduos foram instruídos a abster-se de qualquer meio de enxaguatório bucal, manter os mesmos métodos de higiene nas outras regiões da boca e não alterar a dieta. Foram recomendadas três escovações diárias, sendo que nestas, deveria-se aplicar o gel nas moldeiras em uma quantidade que recobrisse toda a coroa dental, sendo esta mantida em posição durante todo o procedimento de escovação (Figura 4) (Nogueira-Filho *et al.*, 2000; Pannuti *et al.*, 2003).

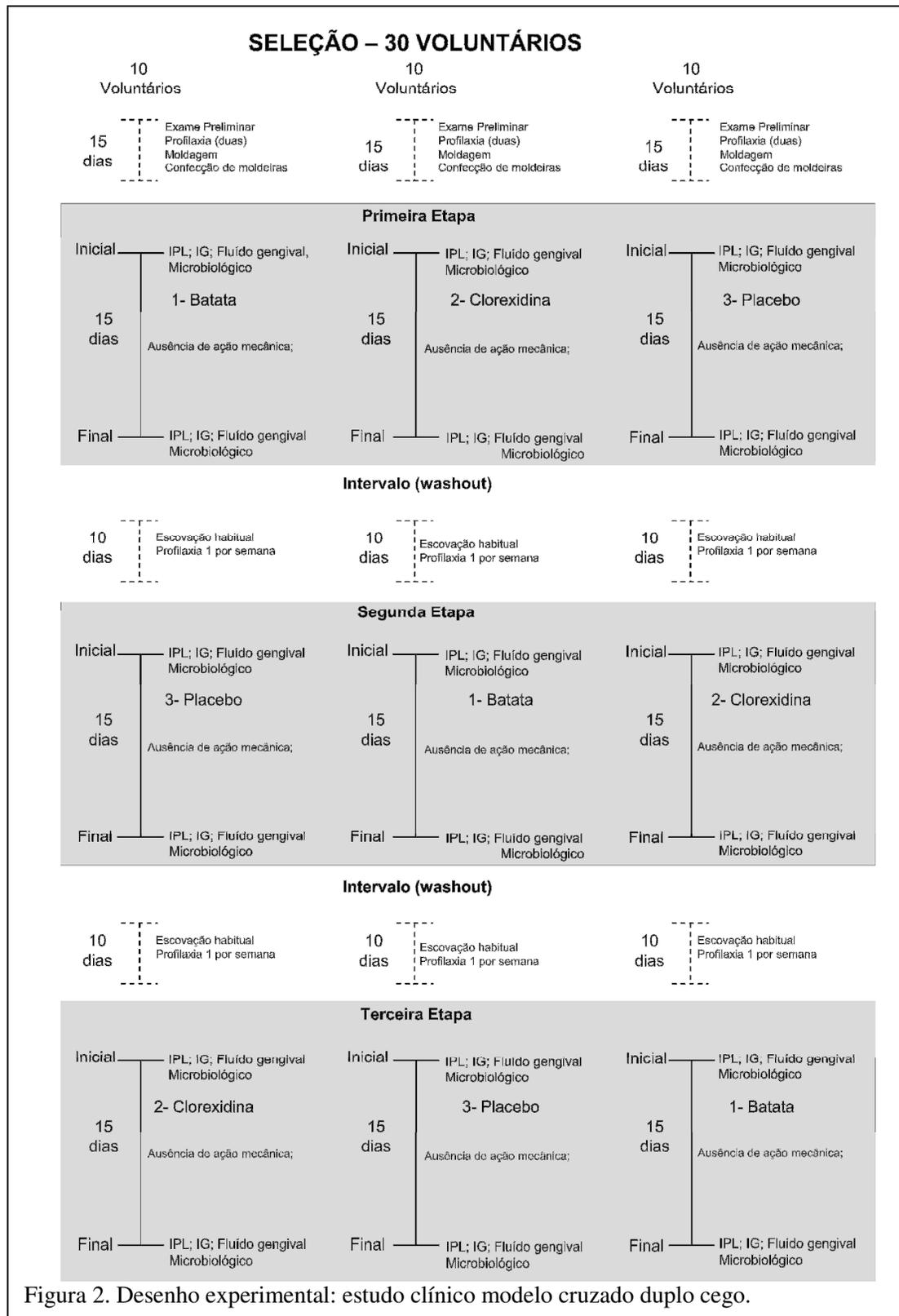


Figura 2. Desenho experimental: estudo clínico modelo cruzado duplo cego.



Figura 3. “Kit Individual”: (A). Moldeiras individuais (dentes 15,16 e 35,36) acondicionadas em porta moldeiras; (B). Seringa descartável (5mL) com ponta aplicadora contendo o gel a ser utilizado; (C e D). Escova dental e dentifrício.

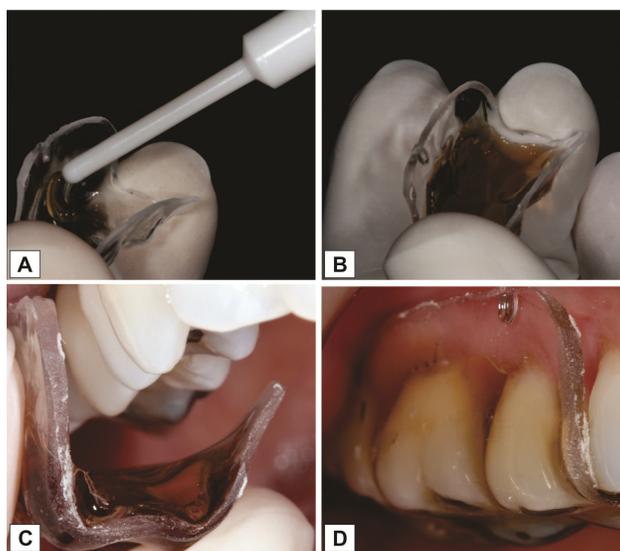


Figura 4. (A, B e C). Aplicação do gel nas moldeiras em uma quantidade suficiente para recobrir a coroa dental; (D). Moldeira com o gel adaptada aos dentes experimentais.

4.8.3 Parâmetros clínicos Avaliados

4.8.3.1 Índice de Placa

O índice de placa (Silness & Loe, 1964) foi utilizado para verificar o biofilme dental presente nas faces vestibular e lingual dos dentes tratados e controle. Esse método baseia-se nos seguintes escores: 0- Ausência de biofilme visível ou detectado com sonda; 1- Biofilme dental próximo à margem gengival visível com o uso da sonda periodontal; 2- Acúmulo moderado de biofilme dental, detectado no exame visual, próximo à margem gengival e sem ultrapassar 1/3 do dente; 3- Grande acúmulo de biofilme na superfície dental, ultrapassando 2/3 da face analisada (Figura 5). Para as faces proximais verificou-se a presença ou ausência do biofilme (Ainamo & Bay, 1975).

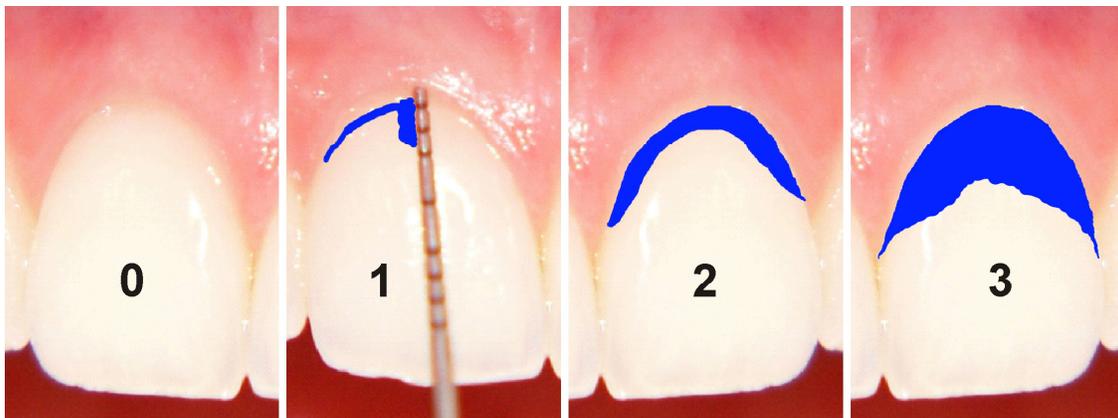


Figura 5. Índice de placa de Silness e Løe (1964): 0- Ausência de biofilme visível ou detectado com sonda; 1- Biofilme dental próximo à margem gengival visível com o uso da sonda periodontal; 2- Acúmulo moderado de biofilme dental, detectado no exame visual, próximo à margem gengival e sem ultrapassar 1/3 do dente; 3- Grande acúmulo de biofilme na superfície dental, ultrapassando 2/3 da face analisada.

4.8.3.2 Índice de sangramento marginal

A inflamação gengival foi avaliada através do índice de sangramento marginal de Mombelli (Mombelli *et al.*, 1987) de acordo com os escores: 0- sem sangramento quando se passa a sonda na margem gengival; 1- pontos isolados de sangramento; 2- sangramento forma uma linha contínua na margem cervical; 3- sangramento abundante (Figura 6). Para a

verificação do sangramento marginal das faces vestibulares e linguais, a sonda periodontal (Williams, Millenium® São Paulo, Brasil), recebeu inclinação de 60° em relação ao longo eixo do elemento dental percorrendo toda a margem gengival (Van Der Weijden *et al.*, 1994). Para as faces proximais analisou-se a presença ou ausência do sangramento marginal à sondagem (Ainamo & Bay, 1975).

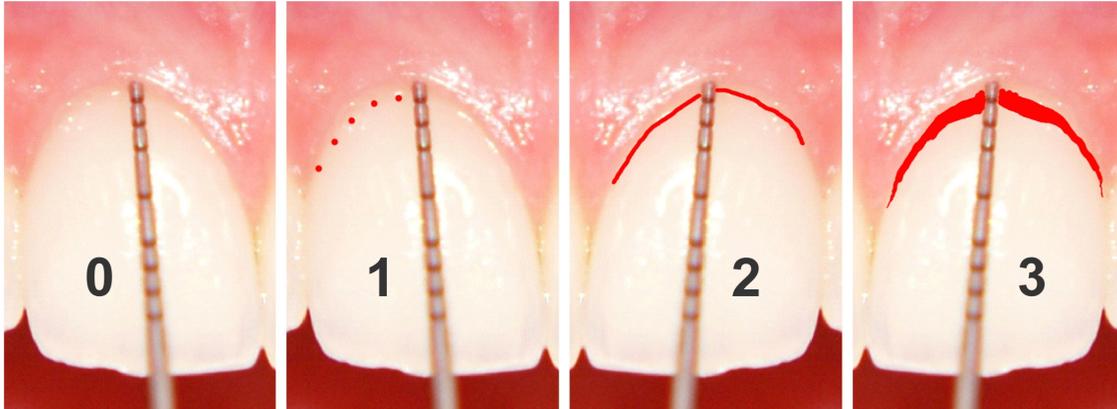


Figura 6. Índice de sangramento marginal (Mombelli *et al.*, 1987): 0- sem sangramento quando se passa a sonda na margem gengival; 1- pontos isolados de sangramento; 2- sangramento forma uma linha contínua na margem cervical; 3- sangramento abundante.

Todos os registros foram realizados sob as mesmas condições e anotados em fichas confeccionadas para o estudo (Anexo 2).

4.8.3.3 Treinamento e reprodutibilidade dos parâmetros clínicos

Os parâmetros foram realizados por um único examinador. A concordância intra-examinador foi testada com o exame de 5 pacientes em dois momentos com intervalo de 1 hora, considerando apenas os pré-molares e molares (16 dentes por voluntário). Foi dada a recomendação para que os voluntários deixassem um arco (superior ou inferior) 48 horas sem escovação, para possibilitar o treinamento de todos os escores. A calibração do índice de sangramento marginal não foi realizada da mesma forma, pois um segundo exame, poderia gerar sangramento devido ao trauma da sondagem, comprometendo desta forma, a confiabilidade do coeficiente de concordância. Assim, para este parâmetro foi realizado apenas um treinamento e discussão dos critérios com um segundo pesquisador utilizando slides clínicos, seguido do treinamento da técnica de sondagem e discussão dos mesmos

parâmetros com os 5 pacientes utilizados para o teste de concordância do índice de placa.

4.8.3.4 Treinamento da metodologia

Foram utilizados os mesmos 5 voluntários da calibração para o treinamento dos parâmetros clínicos. Nesta etapa, foram feitas as moldagens, confecção das moldeiras e determinação da forma de aplicação do gel na moldeira, bem como o volume necessário para o preenchimento da mesma, conforme descrito anteriormente.

4.8.3.5 Avaliação do fluido gengival

O fluido gengival foi coletado (duas coletas por dente) sempre na porção central da face vestibular e lingual/palatina (totalizando 8 coletas por paciente em cada exame do estudo). Utilizaram-se tiras de papel filtro (Whatman grau I) de 2x15mm. Após a área ter sido seca e o biofilme dental removido, as tiras foram inseridas 1 mm abaixo da margem gengival e permanecendo por 30 segundos (Figura 7). As tiras foram armazenadas em frascos plásticos e em seguida coradas com solução alcoólica de ninhidrina a 0,2%. As tiras foram fotografadas e as imagens analisadas com um programa computador (Image Pro Plus® Version 4.5.0.29, Media Cybernetics, Silver Spring, MD, USA) para determinação da quantidade de fluido absorvido em mm².

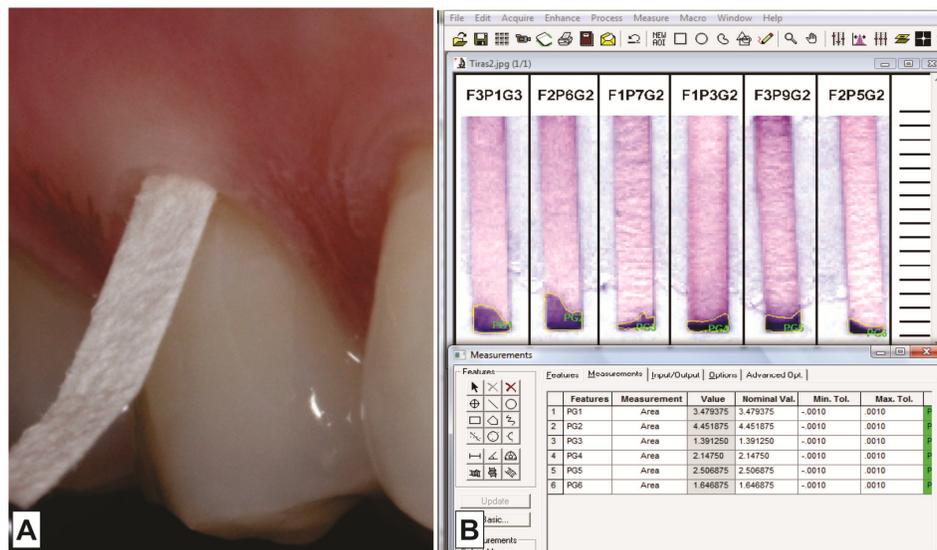


Figura 7. (A). Coleta do fluido gengival com tiras de papel filtro (2x15mm) na porção central da face vestibular e lingual/palatina, inseridas à 1 mm abaixo da margem gengival, permanecendo por 30 segundos. (B). Tiras coradas com solução alcoólica de ninhidrina a 0,2% e analisadas com um programa computador. A quantidade de fluido absorvido foi registrado em mm².

4.8.3.6 Avaliação microbiológica

A análise microbiológica foi realizada por amostragem em 6 voluntários (20% do total) selecionados aleatoriamente, durante as três fases experimentais. As amostras de biofilme supragengival foram coletadas com o auxílio de palito de madeira (15 mm de comprimento) previamente esterilizado, sendo obtida uma amostra para cada dente experimental. Para isso, foi removido o biofilme dental das faces vestibular e lingual a partir da margem gengival. Após coleta, os palitos de madeira foram agrupados, de acordo com o voluntário, em um frasco contendo 1,5 mL de solução salina redutora (NaCl a 0,9% + tioglicolato de sódio a 0,1%) e transportado até o laboratório acondicionado em recipiente com gelo (Figura 8A).

O material coletado foi dispersado por aproximadamente 30 segundos em Vortex-Super-Mixer. Em seguida a partir do homogenizado, alíquotas de 0,1 mL da suspensão foram semeadas em triplicata, com auxílio de alça de Drigalsky em placas de Petri contendo ágar BHI (*Brain Heart Infusion*), sendo as placas incubadas a 37°C/ 24h. A contagem do número de unidades formadoras de colônia por mililitro (UFC/mL) de microrganismos recuperados foi realizada com auxílio de um programa computador (Image Pro Plus® Version 4.5.0.29, Media Cybernetics, Silver Spring, MD, USA) (Figura 8B).

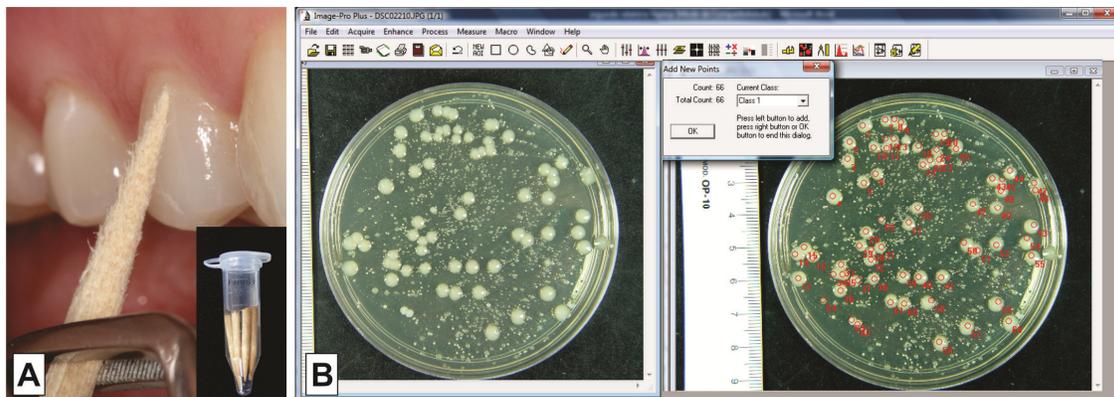


Figura 8. (A). Coleta do biofilme supragengival com palito de madeira, no detalhe a colocação dos palitos em meio de transporte. (B). Contagem do número de unidades formadoras de colônia por mililitro (UFC/mL) de microrganismos recuperados com auxílio de um programa computador.

4.9 Análise estatística

Os resultados obtidos com a análise fitoquímica e testes de controle de qualidade são apresentados de forma descritiva.

Previamente à análise estatística das demais variáveis, a normalidade dos dados foi testada com o teste de Shapiro-Wilks. Desta forma, de acordo com o tipo de distribuição dos dados, optou-se pela aplicação de modelos paramétricos e não paramétricos.

Nas comparações das variáveis edema (orelha e pata) e liberação de citocinas foi utilizada a análise de variância de um critério (*one-way* ANOVA) com pós-teste de Tukey.

As comparações entre os parâmetros clínicos (índice de placa, sangramento marginal, volume de fluido gengival e UFC/mL) inicial e final entre os grupos (inter-grupos) foi realizada com o teste de Friedman para dados pareados, se encontradas diferenças significativas, as comparações múltiplas foram realizadas como o pós-teste de Dunn. As comparações entre os parâmetros clínicos iniciais e finais (intra-grupo) foi realizada com o teste de Wilcoxon. O indivíduo foi utilizado como unidade amostral. Para as comparações dos parâmetros clínicos, presença de biofilme e sangramento marginal (presença ou ausência) nas faces interproximais, os indivíduos foram classificados em escores de acordo com a prevalência de sítios positivos, sendo: Escore 0: indivíduos com ausência (nenhum), Escore 1: indivíduos com presença $\geq 1\%$ e $< 25\%$ (baixo), Escore 2: indivíduos com presença $\geq 25\%$ e $< 75\%$ (moderado), Escore 3: indivíduos com presença $\geq 75\%$ (alto). As comparações inter e intra-grupos foram realizadas da mesma forma como descrito anteriormente.

O nível de significância adotado foi de 5% ($\alpha=0,05$). Todos os cálculos foram realizados com os pacotes estatísticos SPSS (*Statistical Package for the Social Science*) versão 17.0 (SPSS Inc Chigaco Illinois USA) e GraphPad Prism versão 5.00 for Windows (GraphPad Software. San Diego, Califórnia, USA).

5 RESULTADOS

5.1 Testes fitoquímicos

5.1.1 Ensaios fitoquímicos para flavonóides, alcalóides, antraquinonas, cumarinas, taninos e saponinas

Os metabólitos secundários das folhas de batata-doce foram analisados por meio de reações clássicas para triterpenos/esteróides, alcalóides, antraquinonas, cumarinas, flavonóides, saponinas e taninos (Tabela 1), a partir das frações provenientes do extrato hidroalcoólico.

Tabela 1 – Resultados do *screening* fitoquímico para as folhas de batata-doce, a partir das frações do extrato hidroalcoólico

Metabólito secundário	Extrato hidroalcoólico e/ou frações
Triterpenos/esteróides	(+)
Alcalóides	(+)
Antraquinonas	(+)
Cumarinas	(-)
Glicosídeos flavônicos	(+)
Glicosídeos saponínicos	(+)
Taninos	(+)

(+) presença do metabólito (-) ausência do metabólito

As frações apolares que foram submetidas à reação de Liebermann-Burchard, utilizada para verificar a presença de esteróides e/ou triterpenos, demonstraram resultado positivo, conferindo ao ensaio uma coloração rosada.

Para a pesquisa de alcalóides, todas as frações do extrato hidroalcoólico foram investigadas por meio dos reativos de Bertrand, Bouchardat, Dragendorff e Mayer e apresentaram a formação de precipitados característicos, indicando a presença desse grupo de metabólitos secundários no EBHBD.

Os glicosídeos antraquinônicos, avaliados por meio da reação de Bornträger,

expressaram a formação da coloração avermelhada que qualifica a presença desse metabólito.

O ensaio para identificar a existência de cumarinas foi efetuado nas frações obtidas a *partir* do extrato hidroalcoólico, sendo que foi observado o desenvolvimento de fraca fluorescência na câmara de ultravioleta (365 nm), a partir das frações estudadas.

A presença de glicosídeos flavônicos foi determinada a partir das reações de Shinoda, Pacheco, Oxalo-bórica e da reação com zinco. Durante as avaliações, pelo menos uma das frações do extrato hidroalcoólico submetidas aos reativos apresentou resultado positivo, corroborando com a hipótese de haver glicosídeos flavônicos na amostra em estudo.

A formação de espuma persistente na fração que passou por extração com acetato de etila e na fração alcoólica do EBHBD caracterizou a presença de glicosídeos saponínicos. A principal característica das saponinas é apresentar atividade tensoativa, isto é, esses compostos são capazes de formar soluções espumantes persistentes e abundantes quando em solução aquosa.

No procedimento desenvolvido para taninos, a partir de ensaios qualitativos com cloreto férrico 1%, sulfato de ferro amoniacal 5%, gelatina 2,5% e ácido nitroso, foi possível comprovar a presença desse grupo de princípios ativos nas folhas de batata-doce. Os taninos formam complexos insolúveis em água com alcalóides, gelatina e outras proteínas, sendo que esses complexos insolúveis ou formações de precipitado puderam ser visualizados para todos os testes realizados com a amostra.

5.1.2 Quantificação dos metabólitos secundários

5.1.2.1 Quantificação dos fenólicos totais

O resultado obtido na determinação dos fenólicos totais pelo método Folin-Ciocalteu, expressos como equivalentes de ácido gálico em miligramas (EAG) por 100 g de material vegetal seco, foi $662,02 \pm 28,91$ mg, usando a curva padrão do ácido gálico ($R^2 = 0,9945$).

5.1.2.2 Quantificação de alcalóides

O teor de alcalóides totais das folhas de batata-doce (BD) foram medidos como 345,65 ± 15,52 mg por 100 g de amostra seca.

5.1.2.3 Quantificação de antraquinonas

O conteúdo total de antraquinonas das folhas de BD foram determinados como 328,44 ± 8,17 mg de derivados hidroxitriancênicos em 100 g de amostra seca.

5.2 Avaliação das atividades biológicas do EBHBD

5.2.1 Atividade antioxidante

5.2.1.1 Método fosfomolibdênio

Os resultados da avaliação da atividade antioxidante foram expressos na forma de atividade antioxidante relativa AAR% (ác. ascórbico). Os cálculos foram estabelecidos por meio da equação:

$$AAR = \left(\frac{\text{absorvância da amostra} - \text{absorvância do branco}}{\text{absorvância do ácido ascórbico} - \text{absorvância do branco}} \right) \times 100$$

A partir desse cálculo, o EBHBD apresentou moderada atividade antioxidante por redução do complexo fosfomolibdênio, ao adquirir a coloração verde característica, apresentando uma porcentagem de atividade antioxidante relativa de 43% (%AAR=43).

5.2.2 Avaliação do edema de orelha

5.2.2.1 Edema de orelha induzido pela aplicação tópica de TPA

Conforme demonstrado na Figura 9, a aplicação tópica do TPA na orelha dos camundongos promoveu um aumento significativo da espessura após a sexta hora do desafio com esse agente flogístico. Esse evento foi efetivamente revertido de maneira dependente da dose, pela aplicação tópica do EBHBD (0,1; 0,3; 0,6 e 1,0 mg/orelha). O controle positivo utilizado, o glicocorticóide dexametasona (0,05 mg/orelha) também promoveu a inibição do edema induzido por TPA.

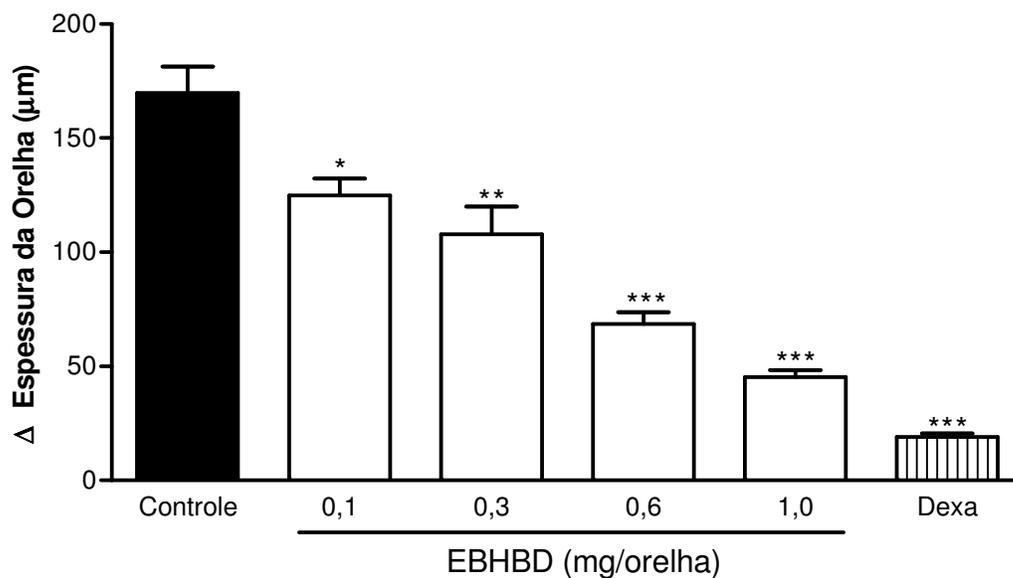


Figura 9. Média e erro padrão do edema de orelha em camundongos induzido por TPA (2,5 μg/orelha) após tratamento com diferentes concentrações de extrato hidroalcoólico de folhas de batata doce. *p<0,05, **p<0,01, ***p<0,001 diferenças significativas em relação ao controle (ANOVA com pós teste de Tukey).

5.3 Manipulação da formulação em gel do EBHBD

As três concentrações de EBHBD manipuladas em gel de hidroxietilcelulose foram definidas a partir do teste de edema de orelha. Assim, as formulações foram elaboradas seguindo as concentrações apresentadas no Quadro 1:

Quadro1– Formulações dos agentes em gel

Géis	Formulação
Gel de EBHBD a 1%	EBHBD 1%; Flavorizante de cereja 0,5%; Propilenoglicol 5%; Solução corante 1%; Gel base de HEC* 3%(m/m) q.s.p. 100g
Gel de EBHBD a 5%	EBHBD 5%; Flavorizante de cereja 0,5%; Propilenoglicol 5%; Solução corante 1%; Gel base de HEC* 3%(m/m) q.s.p. 100g
Gel de EBHBD a 10%	EBHBD 10%; Flavorizante de cereja 0,5%; Propilenoglicol 5%; Solução corante 1%; Gel base de HEC* 3%(m/m) q.s.p. 100g
Gel de digluconato de clorexidina a 2%	Digluconato de clorexidina 2%; Flavorizante de cereja 0,5%; Propilenoglicol 5%; Solução corante 1%; Gel base de HEC* 3%(m/m) q.s.p. 100g
Gel placebo	Flavorizante de cereja 0,5%; Propilenoglicol 5%; Solução corante 1%; Gel base de HEC* 3%(m/m) q.s.p. 100g

* Hidroxietilcelulose [(C₂₄H₃₀O₁₅)n] - Natrosol®

5.3.1 Controle de qualidade das formulações farmacêuticas

5.3.1.1 Determinação dos valores de pH, densidade absoluta e consistência.

A tabela 2 resume os resultados relativos ao pH, densidade absoluta e consistência.

Tabela 2 – Análises físico-químicas: Média e desvio padrão do pH, densidade absoluta e consistência das formulações.

Formulações empregadas	Sem correção de pH	Com correção de pH	Densidade Absoluta (g mL ⁻¹)	Consistência (mm)
Gel de batata-doce 10%	5,43 ±0,27	6,50 ±0,30	1,08 ±0,05	64 ± 3,1
Gel de clorexidina 2%	5,81 ±0,25	6,50 ±0,27	1,05 ±0,07	62 ±2,6
Gel de hidroxietilcelulose 3%	5,61 ±0,28	6,50 ±0,25	1,02 ±0,04	58 ±2,2

*Testes realizados em triplicata

5.3.1.2 Avaliação microbiológica

Não se observou crescimento bacteriano ou fúngico, nos meios de cultura utilizados, para todas as formulações, indicando a adequação ao uso proposto na pesquisa.

As características físico-químicas e microbiológicas das formulações caracterizam e aprovam as formulações para o uso proposto.

5.3.2 Edema de pata induzido por LPS

Conforme demonstrado nas Figuras 10 e 11, a aplicação de LPS 0,1 mL (100 µg) na pata promoveu um aumento significativo da sua espessura após a segunda hora do desafio com esse agente flogístico. Esse evento foi efetivamente revertido pela aplicação tópica do gel EBHBD nas concentrações de 5 e 10%.

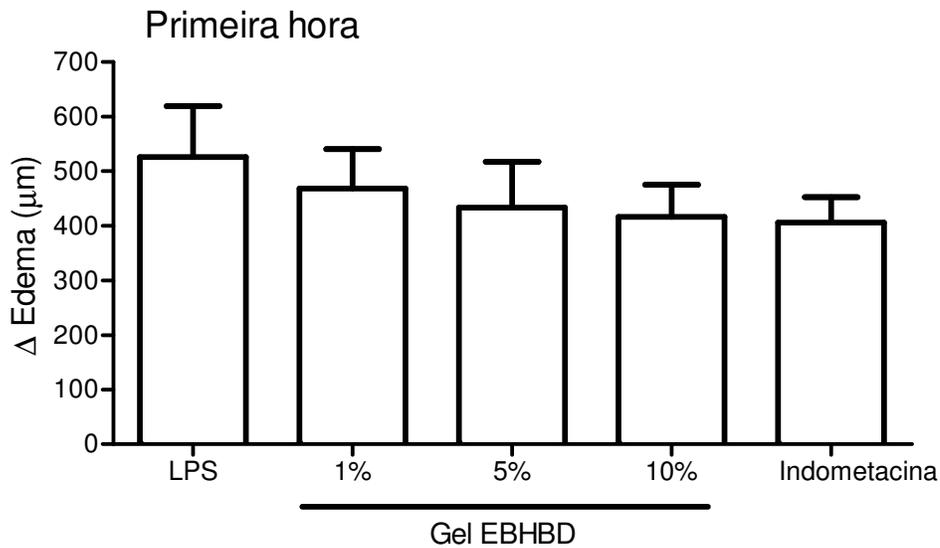


Figura 10. Média e erro padrão do edema de pata em ratos induzido por LPS 0,1mL (100μg/pata) após tratamento com diferentes concentrações de gel contendo EBHBD (extrato bruto hidroalcoólico de batata doce) na primeira hora. Controle positivo: Indometacina (10 mg/Kg). Diferenças não significativas, $p > 0,05$ (ANOVA).

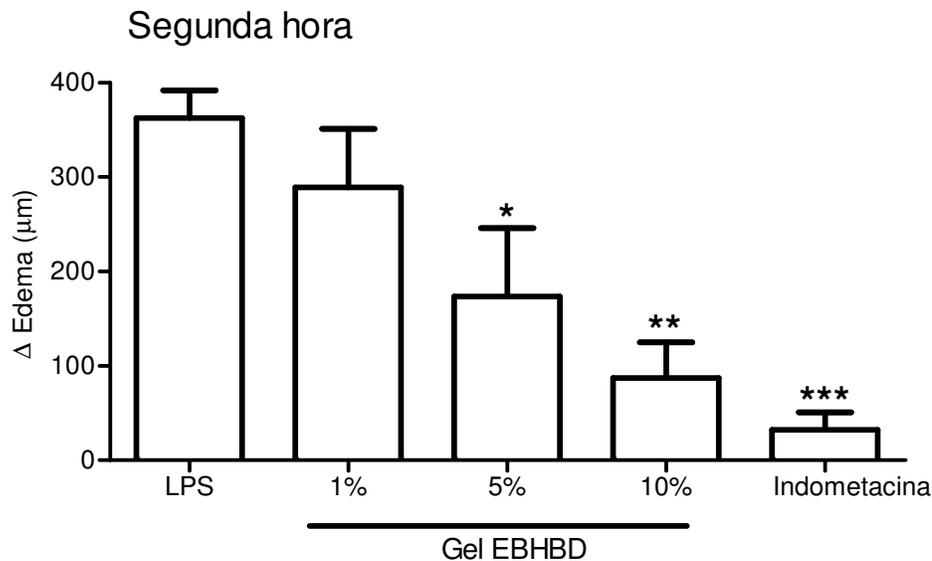


Figura 11. Média e erro padrão do edema de pata em ratos induzido por LPS 0,1mL (100μg/pata) após tratamento com diferentes concentrações de gel contendo EBHBD (extrato bruto hidroalcoólico de batata doce) na segunda hora. * $p < 0,01$ com LPS, ** $p < 0,001$ com LPS e Gel de EBHBD 1%, *** $p < 0,001$ com todos (ANOVA com pós teste de Tukey).

5.3.3 Atividade antioxidante total do gel

A atividade antioxidante do gel contendo batata-doce foi avaliada a partir da mesma equação descrita anteriormente para o extrato bruto. Assim, o gel a 10% também apresentou atividade antioxidante por redução do complexo fosfomolibdênio, ao adquirir a coloração verde característica, apresentando uma porcentagem de atividade antioxidante relativa de 57% (%AAR=57%).

5.3.4 Determinação da concentração inibitória mínima (CIM) do gel contendo EBHBD

Os ensaios de atividade antimicrobiana in vitro mostraram que o gel contendo clorexidina apresentou CIM a partir de 0,078125 mg/mL. Porém, nenhuma concentração do gel contendo EBHBD foi capaz de inibir o crescimento das cepas utilizadas.

5.3.5 Efeito do tratamento do gel contendo EBHBD sobre a liberação de TNF- α e IL-1 β induzidas por LPS em fibroblastos gengivais de humanos in vitro

Nesta série de experimentos, o primeiro passo foi determinar uma dose máxima de LPS para ser utilizada nos demais experimentos. Para isso adicionamos LPS em diferentes concentrações (0,001; 0,1 e 10 μ g/mL), durante um período de 24 horas, aos fibroblastos gengivais cultivados previamente.

Fibroblastos tratados apenas com meio de cultura apresentaram uma pequena liberação basal de TNF- α e IL-1 β . A estimulação dos fibroblastos com LPS 0,001; 0,1 e 10 μ g/mL induziu uma liberação média (erro padrão) de TNF- α de aproximadamente 169,8 (68,75), 321,2 (71,84) e 594,1 (117,8) pg/mL, respectivamente e 129,3 (39,66), 324,7 (78,21) e 494,7 (115,6) pg/mL, respectivamente de IL-1 β . (Fig.12).

O próximo passo foi avaliar o efeito do gel contendo EBHBD sobre a liberação de TNF- α e IL-1 β induzida por LPS (10 μ g/mL). Para isso adicionou-se o gel nas concentrações de 0,1; 1; 10 e 30 μ g/mL, 30 min do antes do LPS. O grupo controle apresentou uma liberação quase nula de citocina enquanto que o gel contendo EBHBD diminuiu a liberação das citocinas avaliadas apenas na concentração de 30 μ g/mL (Fig. 13).

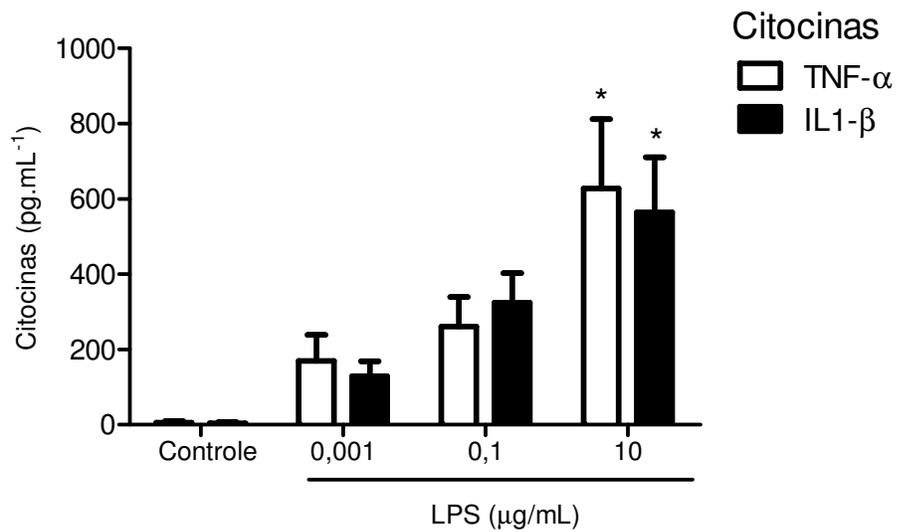


Figura 12. Média e erro padrão da liberação de citocinas (TNF- α e IL1- β) em cultura de fibroblasto gengival de humanos tratados com diferentes concentrações de LPS. Diferenças significativas: * $p < 0,01$ com LPS (0,001 $\mu\text{g/mL}$) e Controle (ANOVA com pós-teste de Tukey).

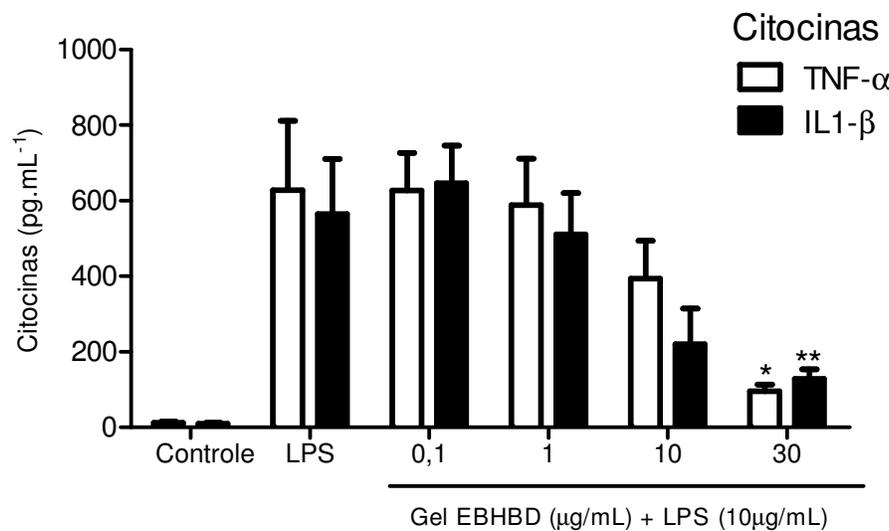


Figura 13. Média e erro padrão da liberação de citocinas (TNF- α e IL1- β) em cultura de fibroblasto gengival de humanos tratados com diferentes concentração de de gel de extrato bruto hidroalcoólico de batata doce (EBHBD) expostos à LPS. Diferenças significativas: * $p < 0,05$ com LPS e Gel EBHBD a 0,1 e 1 $\mu\text{g/mL}$; ** $p < 0,05$ com LPS e Gel EBHBD a 0,1 mg/mL). ANOVA com pós-teste de Tukey.

5.4 Testes de toxicidade

5.4.1 Viabilidade celular pelo método MTT

A viabilidade celular foi avaliada pelo método do MTT, descrita anteriormente. Este teste foi realizado com o objetivo de eliminar a possibilidade de que as alterações ocorridas na liberação das citocinas tenham ocorrido em função de morte celular. O tratamento com o gel não promoveu alteração na viabilidade celular (Fig.14).

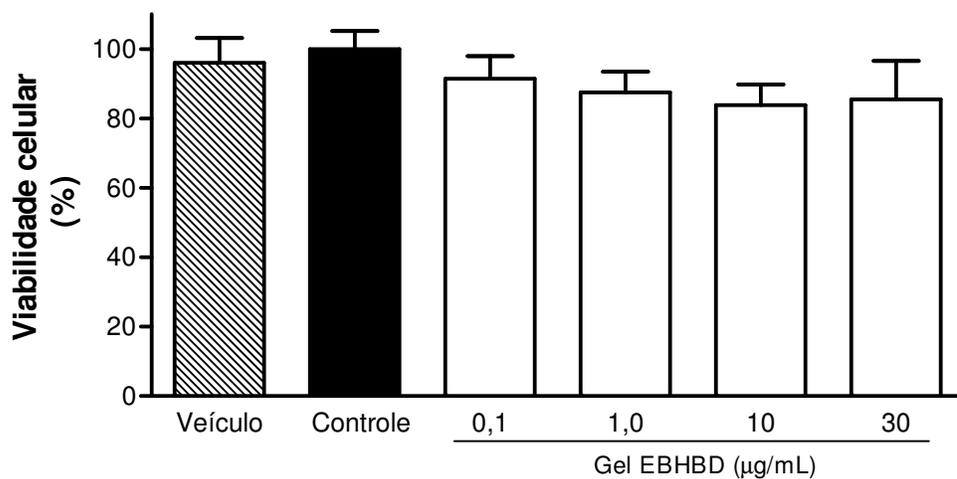


Figura 14. Viabilidade celular (média e erro padrão) avaliada pelo método do MTT. O gel contendo EBHBD (extrato bruto hidroalcoólico de batata doce) não promoveu alteração na viabilidade celular ($p=0,7714$, diferença não significativa, ANOVA).

5.4.2 Teste da *Artemia salina*

O resultado foi obtido contando-se o número de metanúplios do microcrustáceo mortos e vivos em cada tubo de ensaio, através de visualização macroscópica com lupa e a análise estatística descritiva foi feita da contagem do número de sobreviventes calculando-se a porcentagem de mortos. Os microcrustáceos foram considerados mortos quando não exibiam nenhum movimento após 10 segundos de observação (Meyer *et al.*, 1982; Solis *et al.*, 1993; De Siqueira *et al.*, 2001).

Tabela 5. Mortalidade média de *Artemia salina* de acordo com as diferentes formulações e concentrações do EBHBD (extrato bruto hidroalcoólico de folhas de batata doce) após 48 horas de exposição.

Formulações	Nº de organismos expostos (n)	Média de organismos vivos (48h)	Média (%) de organismos mortos (48h)
EBHBD 100ug/mL	10	10	0
EBHBD 500ug/mL	10	10	0
EBHBD 1000ug/mL	10	10	0
Gel de EBHBD 100ug/mL	10	10	0
Gel de EBHBD 500ug/mL	10	10	0
Gel de EBHBD 1000ug/mL	10	10	0
Gel base 100ug/mL	10	10	0
Gel base 500ug/mL	10	10	0
Gel base 1000ug/mL	10	9,6	4
Controle negativo (Solução salina)	10	10	0
Controle positivo (Quinidina 100ug/mL)	10	4,3	57
Controle positivo (Quinidina 500ug/mL)	10	0	100
Controle positivo (Quinidina 1000ug/mL)	10	0	100

5.5 Ensaio clínico

5.5.1 Parâmetros clínicos avaliados

5.5.1.1 Treinamento e reprodutibilidade dos parâmetros clínicos

O resultado do coeficiente Kappa foi de 0,77 para as faces vestibular e lingual (Silness & Loe, 1964) e 0,81 para as faces interproximais (Ainamo & Bay, 1975). Os dados

da concordância para o índice de placa são apresentados nas Tabelas 6 e 7.

Tabela 6- Concordância- Índice de placa (Silness & Løe, 1964) realizado em dois momentos com intervalo de 1 hora. Faces vestibular e lingual.

		Índice de Placa – 2º exame				Total
		0	1	2	3	
Índice de Placa – 1º exame	0	64	4	0	0	68
	1	7	29	2	0	38
	2	2	4	28	3	37
	3	0	0	4	13	17
Total		73	37	34	16	160

Kappa – 0,77 (Concordância considerada – boa)

Tabela 7- Concordância- Índice de placa (Ainamo & Bay, 1975) realizado em dois momentos com intervalo de 1 hora. Faces interproximais.

		Índice de Placa – 2º exame		Total
		0	1	
Índice de Placa – 1º exame	0	62	3	65
	1	12	83	95
Total		74	86	160

Kappa – 0,81 (Concordância considerada – muito boa)

5.5.1.2 Seleção da amostra

Do total de 30 voluntários, 5 foram excluídos, sendo que 3 não cumpriram o protocolo experimental determinado e 2 não retornaram para a segunda avaliação. Não foi observado nenhum efeito adverso com o uso das substâncias durante as fases experimentais.

5.5.1.3 Índice de placa

O resultado da análise do índice de placa nos diferentes grupos experimentais estão expressos nas figuras 15, 16, 17 e 18.

Os resultados mostraram que o índice de placa final de todas as faces (vestibular e lingual) e também com as mesmas analisadas separadamente foram semelhantes. O grupo tratado com clorexidina apresentou os menores valores, não sendo observadas diferenças entre os grupos placebo e batata-doce.

A figura 18 apresenta os dados referentes à presença de biofilme nas faces proximais. Os voluntários foram classificados de acordo com a prevalência de sítios com presença de biofilme, sendo estabelecidos os escores de presença de biofilme (EPB): EPB 0: indivíduos com ausência de biofilme (nenhum), EPB 1: indivíduos com presença de biofilme $\geq 1\%$ e $< 25\%$ (baixo), EPB 2: indivíduos com presença de biofilme $\geq 25\%$ e $< 75\%$ (moderado), EPB 3: indivíduos com presença de biofilme $\geq 75\%$ (alto). Foi possível verificar um aumento da prevalência dos sítios com biofilme em todos os grupos. As comparações inter e intra-grupos foram realizadas da mesma forma como descrito anteriormente.

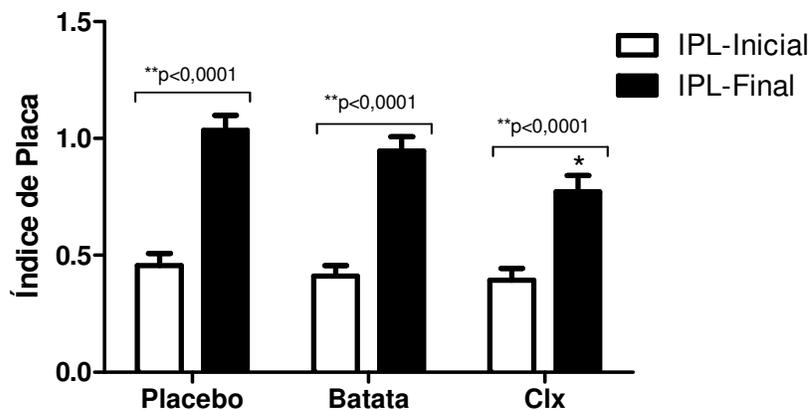


Figura 15. Média e erro padrão dos valores do índice de placa (IPL) inicial e final para os diferentes tratamentos: Gel placebo, Gel de batata 10% e Gel de clorexidina 2% (Clx). Comparação inter-grupo: IPL inicial- p=0,3771 (diferença não significativa); IPL final- p=0,0025 (diferença significativa), *p<0,01 com placebo (Teste de Friedman com pós teste de Dunn). Intra-grupo (inicial e final no mesmo grupo), **diferença estatística significativa entre os valores do índice de placa inicial e final (Teste de Wilcoxon).

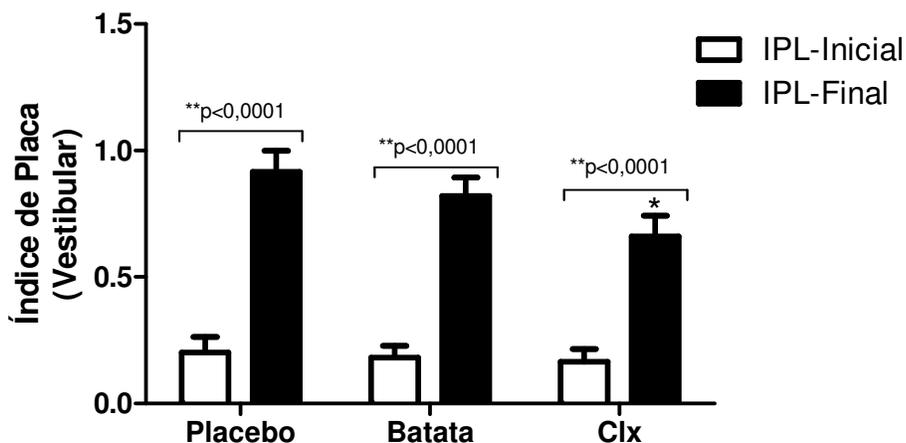


Figura 16. Média e erro padrão dos valores do índice de placa (IPL) inicial e final na face vestibular para os diferentes tratamentos: Gel placebo, Gel de batata 10% e Gel de clorexidina 2% (Clx). Comparação inter-grupo: IPL inicial- $p=0,4692$ (diferença não significativa); IPL final- $p=0,0093$ (diferença significativa), $*p<0,01$ com placebo (Teste de Friedman com pós teste de Dunn). Intra-grupo (inicial e final no mesmo grupo), $**$ diferença estatística significativa entre os valores do índice de placa inicial e final (Teste de Wilcoxon).

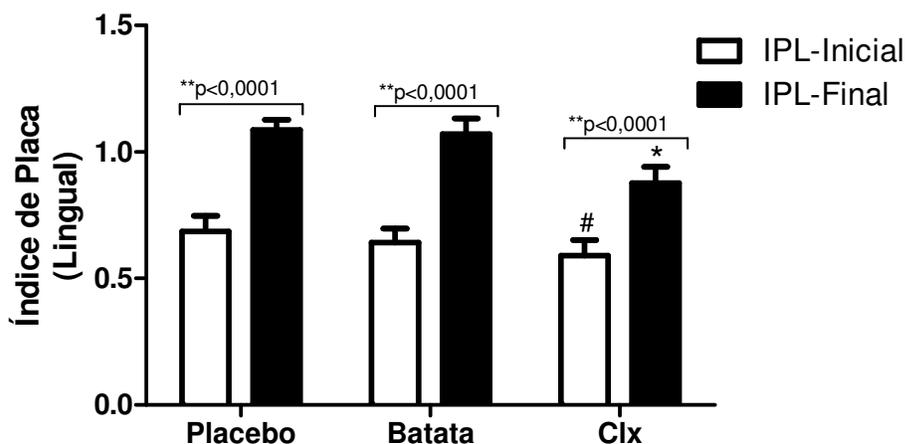


Figura 17. Média e erro padrão dos valores do índice de placa (IPL) inicial e final na face lingual para os diferentes tratamentos: Gel placebo, Gel de batata 10% e Gel de clorexidina 2% (Clx). Comparação inter-grupo: IPL inicial- $p=0,0002$ (diferença significativa), $\#p<0,01$ com placebo; IPL final- $p=0,0029$ (diferença significativa), $*p<0,05$ com placebo e batata (Teste de Friedman com pós teste de Dunn). Intra-grupo (inicial e final no mesmo grupo), $**$ diferença estatística significativa entre os valores do índice de placa inicial e final (Teste de Wilcoxon).

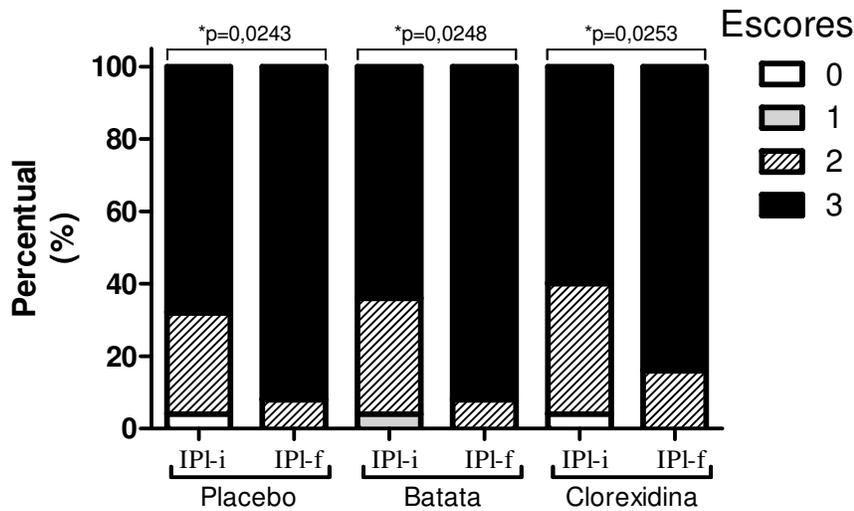


Figura 18. Distribuição de frequência dos escores de presença de biofilme interproximal de acordo com o percentual de sítios, sendo: 0: indivíduos com ausência de biofilme (nenhum), 1: indivíduos com presença de biofilme $\geq 1\%$ e $< 25\%$ (baixo), 2: indivíduos com presença de biofilme $\geq 25\%$ e $< 75\%$ (moderado), 3: indivíduos com presença de biofilme $\geq 75\%$ (alto). Escores de presença de biofilme (EPB) inicial e final nas faces proximais para os diferentes tratamentos: Gel placebo, Gel de batata (EBHBD) 10% e Gel de clorexidina 2%. Comparação inter-grupo: EPB inicial- $p=0,9770$ (diferença não significativa). EPB final- $p=0,5647$ (diferença não significativa) (Teste de Friedman). Intra-grupo (inicial e final no mesmo grupo), *diferença estatística significativa entre EPB inicial e final (Teste de Wilcoxon).

5.5.1.4 Índice de sangramento marginal

O resultado da análise do índice de sangramento marginal nos diferentes grupos experimentais está expresso nas figuras 19, 20, 21 e 22.

Os resultados mostraram que o índice de sangramento marginal final de todas as faces (vestibular e lingual) e também com as mesmas analisadas separadamente foram semelhantes, sem diferenças significativas entre os grupos.

A figura 22 apresenta os dados referentes à presença de sangramento marginal nas faces proximais. Os voluntários foram classificados de acordo com a prevalência de sítios com presença de sangramento marginal, sendo estabelecidos os escores de presença de sangramento marginal (EPSM): EPSM 0: indivíduos com ausência de sangramento marginal (nenhum), EPSM 1: indivíduos com presença de sangramento $\geq 1\%$ e $< 25\%$ (baixo), EPSM 2: indivíduos com presença de sangramento $\geq 25\%$ e $< 75\%$ (moderado),

EPSM 3: indivíduos com presença de sangramento $\geq 75\%$ (alto). Não sendo encontradas diferenças entre os grupos quanto a prevalência de sangramento marginal.

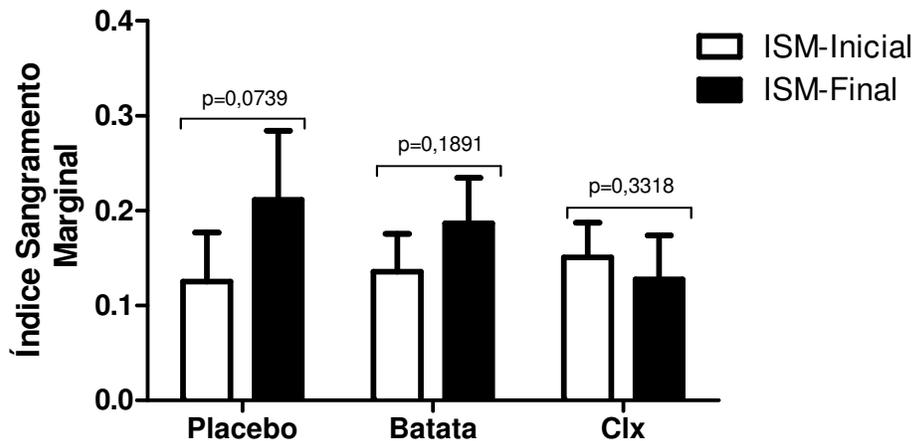


Figura 19. Média e erro padrão dos valores do índice de sangramento marginal (ISM) inicial e final para os diferentes tratamentos: Gel placebo, Gel de batata 10% e Gel de clorexidina 2% (Clx). Comparação inter-grupo: ISM inicial- $p=0,5318$ (diferença não significativa); ISM final- $p=0,3579$ (diferença não significativa) (Teste de Friedman). Intra-grupo (inicial e final no mesmo grupo), diferença estatística não significativa entre os valores do índice de sangramento marginal inicial e final (Teste de Wilcoxon).

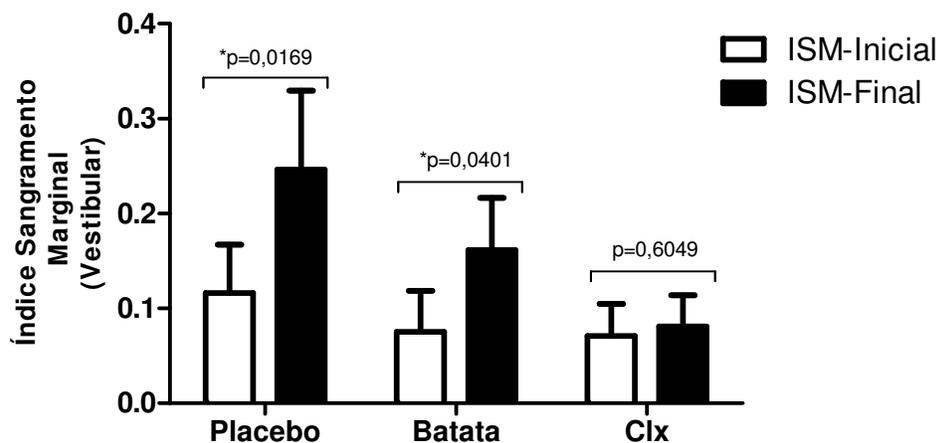


Figura 20. Média e erro padrão dos valores do índice de sangramento marginal (ISM) inicial e final na face vestibular para os diferentes tratamentos: Gel placebo, Gel de batata 10% e Gel de clorexidina 2% (Clx). Comparação inter-grupo: ISM inicial- $p=0,7733$ (diferença não significativa); ISM final- $p=0,1374$ (diferença não significativa) (Teste de Friedman com pós teste de Dunn). Intra-grupo (inicial e final no mesmo grupo), *diferença estatística significativa entre os valores do índice de sangramento marginal inicial e final (Teste de Wilcoxon).

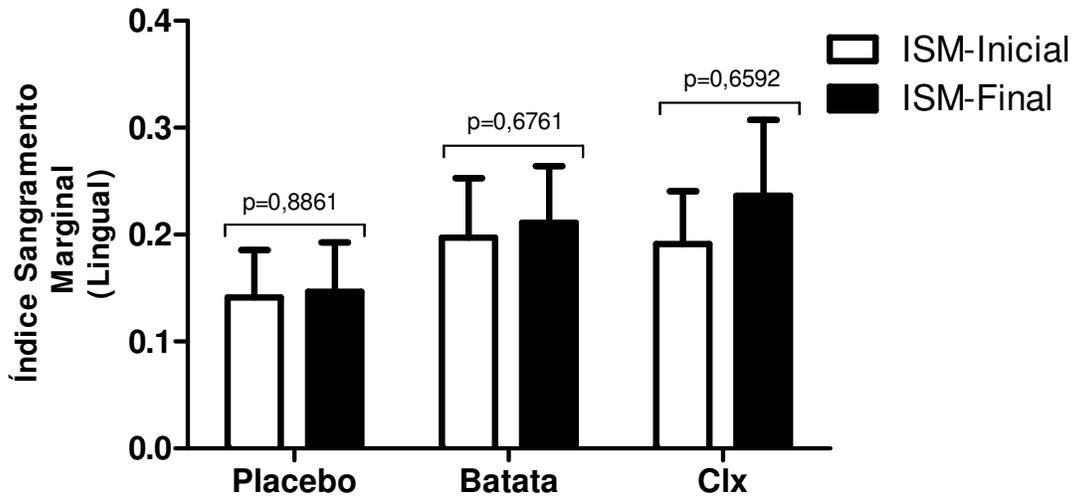


Figura 21. Média e erro padrão dos valores do índice de sangramento marginal (ISM) inicial e final na face lingual para os diferentes tratamentos: Gel placebo, Gel de batata 10% e Gel de clorexidina 2% (Clx). Comparação inter-grupo: ISM inicial- $p=0,3338$ (diferença não significativa); ISM final- $p=0,6650$ (diferença não significativa) (Teste de Friedman com pós teste de Dunn). Intra-grupo (inicial e final no mesmo grupo), diferença estatística não significativa entre os valores do índice de sangramento marginal inicial e final (Teste de Wilcoxon).

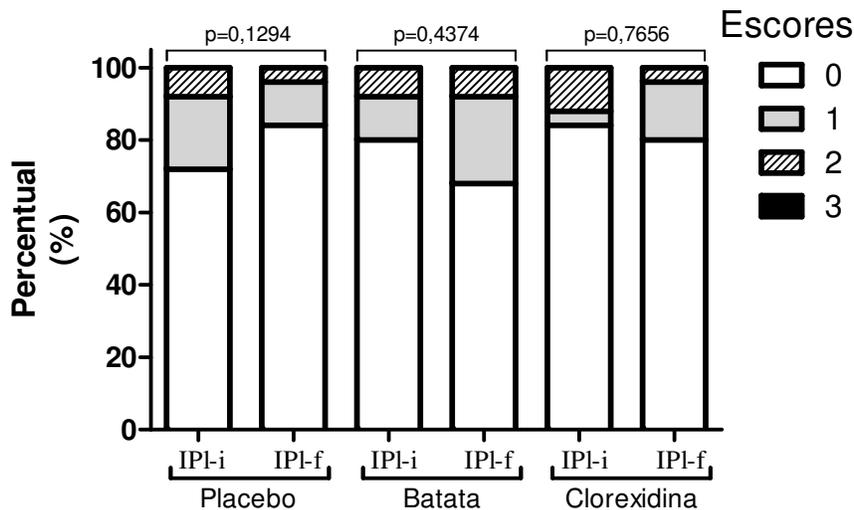


Figura 22. Distribuição de freqüência dos escores de presença de sangramento marginal interproximal de acordo com o percentual de sítios, sendo: 0: indivíduos com ausência de sangramento marginal (nenhum), 1: indivíduos com presença de sangramento $\geq 1\%$ e $< 25\%$ (baixo), 2: indivíduos com presença de sangramento $\geq 25\%$ e $< 75\%$ (moderado), 3: indivíduos com presença de sangramento $\geq 75\%$ (alto). Escores de presença de sangramento marginal (EPSM) inicial e final nas faces proximais para os diferentes tratamentos: Gel placebo, Gel de batata (EBHBD) 10% e Gel de clorexidina 2%. Comparação inter-grupo: EPSM inicial- $p=0,7788$ (diferença não significativa). EPSM final- $p=0,4423$ (diferença não significativa) (Teste de Friedman). Intra-grupo (inicial e final no mesmo grupo), diferença estatística não significativa entre EPSM inicial e final (Teste de Wilcoxon).

Não foram encontradas diferenças estatísticas significantes para a inflamação gengival após o período de tratamento (15 dias) entre os grupos experimentais tanto na região vestibular quanto na região lingual/palatina nos dentes tratados.

5.5.1.5 Avaliação do volume do fluído gengival

Os resultados da análise da quantidade de fluído gengival absorvido nas tiras (mm^2) são apresentados na figura 23. Não foram encontradas diferenças significativas entre os grupos, considerando a análise intra-grupo e inter-grupo.

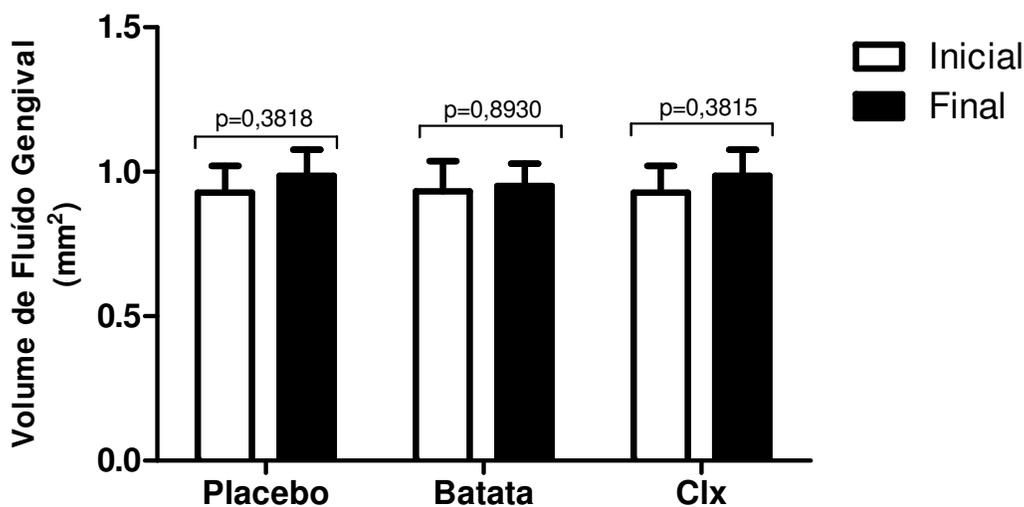


Figura 23. Média e erro padrão do volume de fluído gengival (mm^2) absorvido em papel filtro. Valor inicial e final para os diferentes tratamentos: Gel placebo, Gel de batata 10% e Gel de clorexidina 2% (Clx). Comparação inter-grupo: Inicial- $p=0,1409$ (diferença não significativa); Final- $p=0,9608$ (diferença não significativa) (Teste de Friedman com pós teste de Dunn). Intra-grupo (inicial e final no mesmo grupo), diferença estatística não significativa entre os volumes de fluído gengival inicial e final (Teste de Wilcoxon).

5.5.1.6 Avaliação microbiológica

Os resultados da contagem de UFC/mL estão demonstrados na figura 24. Foram encontradas diferenças significativas entre o placebo com o valores iniciais.

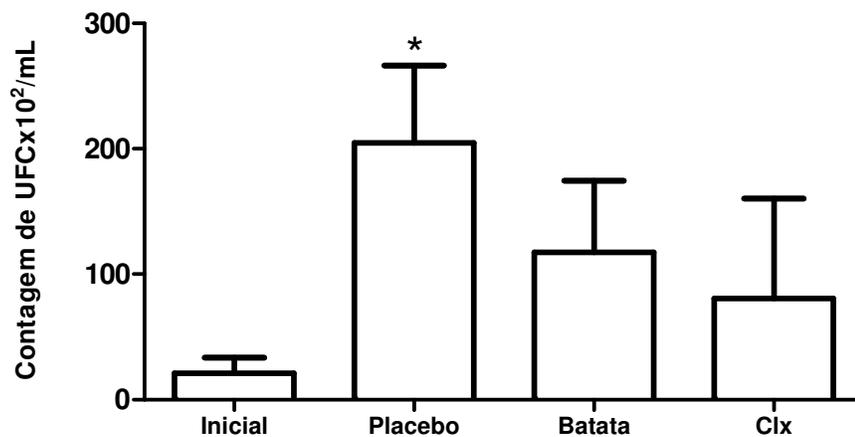


Figura 24. Média e erro padrão da contagem de unidades formadoras de colônias (UFCx 10²)/mL das amostras coletadas das superfícies dos dentes experimentais. Valor inicial e final para os diferentes tratamentos: Gel placebo, Gel de batata 10% e Gel de clorexidina 2% (Clx). *p<0,01 (diferença significativa) com inicial (Teste de Friedman com pós teste de Dunn).

6 DISCUSSÃO

Com o objetivo de evidenciar as substâncias (metabólitos secundários/primários) responsáveis pelas ações farmacológicas do extrato de *Ipomoea batatas* L (Lam) realizou-se a análise fitoquímica qualitativa e quantitativa.

As frações de *n*-hexano e clorofórmio do EBHBD mostraram resultados positivos para triterpenos e / ou esteróides por reação de Liebermann-Burchard. Embora os dados disponíveis para BD sejam limitados, foi relatada previamente a presença de fitoesteróis em tubérculos maduros e imaturos de *Ipomoea mauritiana* Jacq. (Khan *et al.*, 2009). Os terpenóides como o sitosterol e o estigmasterol tem sido empregados como matérias-primas para a indústria farmacêutica, na obtenção de anti-inflamatórios esteroidais (Bruneton, 1991).

Alcalóides foram observados pela formação de precipitado de coloração laranja, vermelho-alaranjado ou castanho-alaranjado nas frações clorofórmica e álcool residual a partir das reações de Dragendorff, Bertrand e Bouchardat. O teor de alcalóides totais das folhas de BD foram medidos como $345,65 \pm 15,52$ mg por 100 g de amostra seca. Um tipo de alcalóide chamado *Ipomina* A foi encontrado em raízes tuberosas de BD (Prieto *et al.*, 1999). *I. mauritiana* também apresentou alcalóides em seus tubérculos (Hsu *et al.*, 2003). No entanto, trabalhos que estudaram algumas características nutritivas e anti-nutritivas de BD não mencionaram a presença de alcalóides (Zheng & Clifford, 2008). Porém, devido à sua ampla atividade farmacológica e toxicológica, o teor de alcalóides deve ser cautelosamente avaliado. (Locher *et al.*, 1995; Velloso *et al.*, 2004).

Para antraquinonas, a reação de Bornträger mostrou uma resposta positiva na coloração vermelha para as frações acetato de etila e álcool residual do EBHBD. As antraquinonas possuem atividade laxante predominante, além de efeito potencial como antibacteriano, antifúngico, antiviral e antitumoral (Falkenberg *et al.*, 2007). A quantidade total de antraquinonas das folhas de BD foram determinadas como $328,44 \pm 8,17$ mg de derivados hidroxitriancênicos em 100 g de amostra seca. Raízes de *Ipomoea acetosifolia* e *Ipomoea pes-caprae* (L.) apresentaram algumas propriedades purgativas, provavelmente devido ao seu teor de antraquinona (Mors *et al.*, 2000). No entanto, poucos dados têm

relacionado à presença deste metabólito secundário em folhas de *Ipomoea* spp.

A fluorescência detectada pelo teste de UV (365 nm) indicou a presença de cumarinas na fração acetato de etila e álcool residual do EBHBD. As cumarinas são amplamente distribuídas nos vegetais e possuem diversas propriedades farmacológicas, como atividade imunossupressora, vasodilatadora, antiespasmódica, antimicrobiana e antiviral (Kuster & Rocha, 2007; Samy & Gopalakrishnakone, 2010). Apesar de um pequeno número de trabalhos ter sido realizado para estudar cumarinas de *Ipomoea* spp., um trabalho prévio isolou e caracterizou duas cumarinas (umbeliferona e escopoletina) das partes aéreas de *Ipomoea cairica* (L.) (Burka & Kuhnert, 1997).

A presença de flavonóides foi verificada nas frações clorofórmica, acetato de etila e álcool residual quando tratadas com os reagentes de Shinoda, solução ácida oxalo/bórica e de zinco. A quantidade de flavonóides têm sido amplamente investigada nas espécies de *Ipomoea*. Os flavonóides, a partir da sua diversidade estrutural, possuem atividade antitumoral, anti-inflamatória, antimicrobiana, antiviral, antioxidante, entre outras (Zuanazzi & Montanha, 2007; Samy & Gopalakrishnakone, 2010). Recentemente, antocianinas, catequinas, flavonóides e proantocianidinas das folhas de batata-doce foram identificadas e quantificadas usando cromatografia líquida de alta performance combinada com detector de fotoiodo (Mors *et al.*, 2000). Os flavonóides foram também detectados em tuber maduro e imaturo de *I. mauritiana* (Hsu *et al.*, 2003). Portanto, a presença de flavonóides na *Ipomoea* spp pode ser usada como fator quimiotaxonômico destas espécies.

A presença de saponinas, as quais apresentam ação anti-inflamatória e antiviral in vitro (Schenkel *et al.*, 2007) foi confirmada pela propriedade de formação de espuma destes metabólitos secundários a partir de uma solução aquosa obtida da fração hidroalcoólica residual do EBHBD. Saponinas triterpenos foram também identificados em tubérculos de BD (Shih *et al.*, 2009).

Os taninos são substâncias que auxiliam no processo cicatricial (feridas, queimaduras) e inflamações através da formação de uma camada protetora (complexo tanino-proteína e/ou polissacarídeo) sobre a mucosa/pele danificada, ocorrendo abaixo desta, a reestruturação do epitélio e formação de vasos (Santos & De Mello, 2007). A

fração hidroalcoólica residual do EBHBD apresentou resultado positivo para presença de taninos nos testes da solução aquosa de gelatina, cloreto férrico 1% e solução aquosa de sulfato de amônio férrico 5% em HCl 2 mol L⁻¹. Os taninos foram previamente verificados nas folhas de BD como componentes antinutrientes (Zheng & Clifford, 2008).

Ácidos fenólicos como derivados hidroxicinâmicos e hidroxibenzóicos foram identificados em um estudo que avaliou folhas de BD através do reagente de Carrez (3,6% de ferrocianeto de potássio e sulfato de zinco 7,2% em solução aquosa) (Mors *et al.*, 2000; Khan *et al.*, 2009). Devido às atividades anti-mutagênicas, anti-diabéticas e antimicrobianas destes ácidos orgânicos, trabalhos recentes têm se dedicado a investigar estes compostos na BD (Yuan *et al.*, 2004; Markert *et al.*, 2008; Dini *et al.*, 2009; Evans, 2009). Um maior teor de ácidos fenólicos foi demonstrado nas folhas de BD quando comparado às maiores folhas vegetais comerciais (Velloso *et al.*, 2004). No entanto, esses produtos naturais não foram detectados na raiz tuberosa de BD (Markert *et al.*, 2008).

Apesar da falta de informação sobre metabólitos secundários especialmente para BD, extensivos dados estão disponíveis para *Convolvulaceae*. Os produtos naturais registrados para as espécies desta família podem ser classificadas como policetídeos, terpenóides (mono, sesqui, di e triterpenóides), esteróides, cumarinas e derivados do ácido benzóico e cinâmico, flavonóides (flavonóis, antocianinas, flavonas, flavanonas), xantinas, alcalóides (pirrolidinas, tropanos, indolizidines e ergolinas), e outros compostos (Burka & Kuhnert, 1997). Assim, os metabólitos observados nas folhas de BD estão de acordo com os produtos químicos encontrados na *Convolvulaceae*.

O uso do gel de batata-doce a 10% foi baseado no teste de atividade anti-inflamatória de edema de pata induzido por LPS em ratos. O LPS, um agente inflamatório, produz inflamação por liberação de prostaglandinas, ocasionando a formação de edema. Foi observado que a atividade antiedematogênica do gel testado foi dependente da dose na segunda hora. É possível que, assim como a dexametasona, componentes deste extrato inibam a biossíntese de prostaglandinas (Farsam *et al.*, 2000). Portanto, considerando o interesse em obter um efeito máximo a partir da espécie vegetal, foi adotada a concentração de 10% para a realização do estudo clínico e testes *in vitro*. O extrato hidroalcoólico de

folha de batata-doce não apresentou efeito anti-inflamatório no edema de pata induzido pelo composto 48/80 (Perez & Hakumata, 1999). Porém, a inflamação é um processo complexo envolvendo a atuação de vários mediadores. O composto 48/80, diferente do LPS, degranula os mastócitos e libera a histamina, um outro importante mediador do processo inflamatório (Dale, 1994).

As formulações farmacêuticas foram manipuladas em gel aquoso de hidroxietilcelulose a 3% (m/m). Considerando que o extrato hidroalcoólico bruto de batata-doce revela uma composição fitoquímica complexa, e que o digluconato de clorexidina apresenta características catiônicas, a hidroxietilcelulose (Natrosol®, PharmaSpecial® – São Paulo – Brasil) foi selecionada para a elaboração das fórmulas farmacêuticas, uma vez que se trata de um polímero celulósico não iônico, compatível com ambas as substâncias ativas mencionadas. O flavorizante (cereja) que foi utilizado com a finalidade de mascarar o sabor das preparações, não possuía qualquer atividade antimicrobiana e/ou anti-inflamatória (Appel & Reus, 2005; Ferreira & Brandão, 2008).

Diversas alterações patológicas da cavidade bucal, como o câncer, estão relacionadas ao estresse oxidativo. O estresse oxidativo leva a danos em lipídeos, DNA, proteínas e organelas celulares, provocando alterações da estrutura e função celulares, que podem resultar no desenvolvimento de câncer, envelhecimento precoce, doenças cardiovasculares, entre outras. O consumo de substâncias antioxidantes naturais (presentes nas plantas) pode levar à inibição da formação de radicais livres (substâncias reativas) e está associado a uma menor incidência de eventos relacionados ao estresse oxidativo. Os antioxidantes não enzimáticos incluem o ácido ascórbico, a vitamina E, os carotenóides e os compostos fenólicos (Asolini *et al.*, 2006; Lima *et al.*, 2006).

A atividade antioxidante do EBHBD e do gel de hidroxietilcelulose com 10% de EBHBD, empregado no estudo clínico, foi avaliada pelo método fosfomolibdênico. O ensaio do fosfomolibdênio ou de redução do complexo fosfomolibdênico tem sido utilizado para avaliar a capacidade antioxidante total de diversas substâncias, a partir da redução do molibdênio (VI) (Mo^{+6}) para molibdênio (V) (Mo^{+5}), com a formação de um complexo fosfato- Mo^{+5} de coloração verde, em pH ácido (Prieto *et al.*, 1999).

A atividade antioxidante relativa de $42,94 \pm 0,89\%$ para o EBHBD e $56,55 \pm 0,79\%$ para o gel contendo EBHBD à 10% foi obtida em comparação como o ácido ascórbico. Este valor representa um potencial moderado na redução do complexo fosfomolibdênio que pode sugerir que a BD seja uma fonte alternativa viável de antioxidantes. Em dados anteriores, resultados semelhantes para raízes tuberosas de BD foram obtidos por diferentes métodos analíticos, por exemplo, radical 1,1-difenil-2-picrylhydrazyl (DPPH) e tiocianato férrico (Evans, 2009).

Os compostos fenólicos presentes em vegetais são os principais componentes com atividade antioxidante. Essa atividade é atribuída às suas propriedades de óxido-redução, que desempenham importante papel na adsorção ou neutralização de radicais livres (Lima *et al.*, 2006). O conteúdo de fenólicos totais das folhas de BD foi $662,02 \pm 28,91$ mg equivalentes de ácido gálico (GAE) por 100 g de amostra seca. Um estudo anterior demonstrou que as raízes tuberosas de cinco variedades de BD apresentaram quantidade de compostos fenólicos que variaram entre 192,7-1159,0 mg equivalentes de ácido gálico (GAE) por 100 g de amostra seca (Evans, 2009). Portanto, os resultados obtidos estão de acordo com alguns dados encontrados em raízes tuberosas de BD. Além disso, as folhas de BD também podem ser consideradas uma grande fonte de substâncias fenólicas (por exemplo, flavonóides, ácidos fenólicos, taninos e tocoferóis), com um potencial uso medicinal, como anteriormente mencionado para tubérculos. Dessa forma, a moderada atividade antioxidante observada pode ser justificada pela grande quantidade de compostos fenólicos detectados no EBHBD.

O estudo da atividade antimicrobiana *in vitro* demonstrou que, de forma oposta ao gel de clorexidina 2%, o EBHBD a 10% não possui ação antimicrobiana contra nenhum microrganismo testado. Em um trabalho prévio foi revelada a atividade antimicrobiana de três diferentes tipos de batata-doce contra *Escherichia coli* O157: H7, *Bacillus cereus* e *Staphylococcus aureus*. Os principais componentes deste extrato antibacteriano foram polissacarídeos e proteínas (International pharmacopoeia, 2006). O resultado negativo observado no presente estudo pode estar relacionada às diferenças na composição fitoquímica e testes antimicrobianos realizados.

As citocinas pró-inflamatórias TNF- α e IL-1 β apresentaram um aumento de liberação no meio de cultura após a estimulação com LPS. No entanto, quando as células foram cultivadas com LPS em presença de 30 μ g/mL de gel de EBHBD a 10%, houve uma redução da liberação das citocinas, sugerindo um possível efeito anti-inflamatório. Como comprovado neste estudo, a presença de flavonóides e saponinas no EBHBD pode ter sido responsável pela redução da expressão de citocinas, visto que estes compostos apresentam esta propriedade (Mors *et al.*, 2000; Hsu *et al.*, 2003; Schenkel *et al.*, 2007; Zuanazzi & Montanha, 2007; Samy & Gopalakrishnakone, 2010). Esse achados foram confirmados com os ensaios em animais, em que a batata-doce reduziu o edema de pata e orelha. A batata-doce já demonstrou potencial para inibição da expressão das citocinas pró-inflamatórias (IL-1 β , IL-6 e TNF- α) induzidas pela injeção de LPS bacteriano (Wang *et al.*, 2010).

É importante ressaltar que a redução da liberação de TNF- α e IL-1 β provocada pelo gel contendo EBHBD não está relacionada com morte celular. Este fato foi comprovado pelo teste de viabilidade celular realizado com MTT. Além disso, já foi estabelecida uma relação entre o grau de toxicidade e a concentração letal média (CL₅₀), apresentada por extratos de plantas sobre larvas de *A. salina*, desde então, considera-se que quando são verificados valores acima 1000 μ g/mL, estes, são considerados atóxicos (Meyer *et al.*, 1982; Solis *et al.*, 1993; De Siqueira *et al.*, 2001; Carballo *et al.*, 2002). Sendo assim, considerando o teste do MTT e da *A. salina*, o EBHBD se mostrou atóxico.

No estudo clínico, o efeito antiplaca e antigengivite do EBHBD foi avaliado utilizando-se um modelo de gengivite experimental parcial em humanos, sendo os voluntários submetidos a todos os tratamentos do estudo, gel placebo, gel de clorexidina 2% e gel de batata-doce 10% em um modelo cruzado duplo-cego (Nogueira-Filho *et al.*, 2000). Foram avaliados o índice de placa, o índice de sangramento marginal e fluído gengival. A análise microbiológica foi realizada em amostras de biofilme dental obtidas de 6 voluntários (20% da amostra) selecionados aleatoriamente.

O índice de placa (Silness & Løe, 1964) é amplamente utilizado na literatura, e foi escolhido para quantificar o acúmulo de biofilme dental (Albert-Kiszely *et al.*, 2007;

Baumgartner *et al.*, 2009). Assim como outros índices, este instrumento de avaliação apresenta certo grau de subjetividade. Portanto, para assegurar a reprodutibilidade, as avaliações foram executadas por um único examinador previamente calibrado, que obteve índice de concordância Kappa = 0,77. Nas faces proximais foi analisada apenas a presença e a ausência do biofilme, sendo o Kappa = 0,81 (valores superiores a 0,60 são considerados adequados para ensaios clínicos).

A condição gengival foi avaliada através de sangramento marginal à sondagem baseia em um achado clínico claramente definido (Mombelli *et al.*, 1987). O mesmo critério também foi empregado por outros estudos que avaliaram as propriedades antimicrobianas e anti-inflamatórias de agentes utilizados na forma de gel e colutórios (Charles *et al.*, 2001; Albert-Kiszely *et al.*, 2007; Schiffner *et al.*, 2007; Trombelli *et al.*, 2008). Todavia, a sondagem marginal inviabiliza a calibração, pois um segundo exame, poderia causar um sangramento adicional, mascarando o resultado. Desta forma, realizou-se apenas um treinamento clínico e não a calibração prévia do examinador.

Em ambos os critérios de avaliação, optou-se pelo exame de elementos específicos (15, 16, 35 e 36). Tais dentes foram selecionados por serem dentes posteriores, não apresentam interferência com a estética, tendo assim, melhor aceitação por parte dos voluntários. Além disso, a redução do número de dentes examinados possibilitou a realização adequada de repetidos exames clínicos, de forma mais rápida e com menor custo. Porém, deve-se considerar que o uso de dentes específicos pode gerar vieses, devido a ampla variação do acúmulo de placa e sangramento gengival em diferentes regiões da dentição. A utilização de um delineamento que exclui a ação mecânica, contribuiu para minimizar possíveis vieses de se utilizar registros parciais. (Salgado *et al.*, 2006; Deinzer *et al.*, 2007).

Os resultados mostraram que o índice de placa final foi semelhante entre os grupos tratados com batata-doce e placebo. O grupo tratado com clorexidina apresentou os menores valores. Inúmeros estudos demonstraram a eficácia da clorexidina na redução e formação do biofilme dental, sendo um antimicrobiano de amplo espectro com alto poder desinfetante, sendo por isso utilizado como controle positivo (Herrera *et al.*, 2007; Marinho

& Araújo, 2007; Asokan *et al.*, 2009). A análise de microrganismos totais do biofilme supragengival confirmou esses resultados.

Este foi o primeiro ensaio clínico realizado com o objetivo de investigar o efeito da *Ipomoea batatas* (L.) Lam. sobre o biofilme dental e inflamação gengival. O grupo gel do EBHBD 10% não demonstrou diferenças estatísticas no exame final do índice de placa quando comparado ao grupo placebo, não sendo possível observar atividade antimicrobiana da batata.

Ao analisarmos os valores do índice de sangramento marginal e quantidade de fluido gengival absorvido nas tiras, os resultados foram semelhantes entre os grupos, sem diferenças significativas, confirmando os achados clínicos. Para se estimar o volume coletado, foi utilizado o método colorimétrico com ninhidrina 0,2% em solução alcoólica, medindo a área de absorção do fluido em mm^2 . Apesar de haver métodos mais sofisticados (eletrônico) para análise do fluido gengival, ambos os métodos (colorimétrico e eletrônico) são eficazes na quantificação das amostras de fluido gengival (Suppipat, 1977; Goodson, 2003).

Alguns aspectos devem ser considerados na interpretação dos dados obtidos. A sistematização dos procedimentos, segundo a sequência pré-determinada pelos pesquisadores, poderia melhorar o entendimento do voluntário no transcorrer da pesquisa. Porém, por outro lado, pode também ter ocorrido um entusiasmo nas primeiras fases e desmotivação nas fases finais. O efeito “Hawthorne” (Van Der Weijden & Hioe, 2005) também pode ter tido algum tipo de influência. Este fenômeno refere-se ao fato do voluntário melhorar suas atitudes, pelo simples fato de ter conhecimento que está participando de um estudo, e de alguma forma estar sob qualquer tipo de avaliação. Apesar dos voluntários terem sido orientados, a sempre utilizarem a moldeira parcial para excluir a ação mecânica da escova, é possível que devido o conhecimento prévio do horário de retorno, alguns voluntários deliberadamente poderiam ter utilizado a escova. Essa suspeita ocorreu, pois mesmo após a exclusão da ação mecânica os parâmetros clínicos permaneceram baixos em todos os grupos. O modelo de estudo cruzado pode ter

contribuído para minimizar o efeito destas e outras variáveis não controláveis (Salgado *et al.*, 2006).

A seleção de estudantes universitários neste presente estudo poderia ter influenciado os resultados, visto que os mesmos apresentavam boa condição de saúde bucal inicial, com baixos índices de placa e ausência de gengivite pré-existente. Os resultados poderiam ser diferentes se fossem incluídos indivíduos com doença periodontal. Outro aspecto importante que pode ter tido influência, principalmente na inflamação gengival, foi o período experimental utilizado (15 dias). Esse tempo é adequado para estudos que analisam a formação de biofilme dental (Kinane, 2001; Bernimoulin, 2003; Kolenbrander *et al.*, 2006). No entanto, para a indução da inflamação gengival, esse período poderia não ter sido suficiente (Løe *et al.*, 1965; Nogueira-Filho *et al.*, 2000; Yates *et al.*, 2003).

Não foram observados efeitos adversos nos tecidos moles e/ou manchamento nos dentes com o uso dos agentes utilizados. Portanto, o uso da batata-doce se mostrou seguro sem causar irritação aos tecidos.

7 CONCLUSÃO

De acordo com a metodologia empregada, pode-se concluir que:

- O EBHBD apresentou em sua composição flavonóides, alcalóides, antraquinonas, taninos e saponinas. Sua atividade anti-inflamatória pode ser sugerida a partir do redução do edema de orelha induzido em camundongos. A atividade antioxidante foi considerada moderada e sua toxicidade nula.

- O gel de EBHBD apresentou atividade anti-inflamatória a partir da redução do edema de pata em ratos e diminuição da liberação das citocinas pró-inflamatórias TNF- α e IL-1 β em cultura de fibroblastos gengivais de humano. A atividade antioxidante foi moderada. A toxicidade e a atividade antimicrobiana in vitro, contra os microrganismos testados, foram nulas;

- No estudo clínico, sugere-se que o gel não apresentou atividade antimicrobiana e não influenciou a inflamação gengival em comparação com o placebo e clorexidina.

REFERÊNCIAS*

ABIFISA Associação Brasileira das Empresas do Setor Fitoterápico, Suplemento Alimentar e de Promoção da Saúde. Quantas pessoas usam fitoterápicos no Brasil e no mundo? 2010 [acesso 14 de agosto 2010]. Disponível em: <http://www.abifisa.org.br/faq.asp>.

Ainamo J, Bay I. Problems and proposals for recording gingivitis and plaque. *Int Dent J*. 1975; 25(4):229-35.

Albert-Kiszely A, Pjetursson BE, Salvi GE, Witt J, Hamilton A, Persson GR, et al. Comparison of the effects of cetylpyridinium chloride with an essential oil mouth rinse on dental plaque and gingivitis - a six-month randomized controlled clinical trial. *J Clin Periodontol*. 2007; 34(8):658-67.

ANVISA Agência Nacional da Vigilância Sanitária. Resolução RDC nº.48, de 16 de março de 2004 Brasília. 2004 [acesso 14 de agosto 2010]. Disponível em: <http://www.anvisa.gov.br/medicamentos/fitoterapicos/legis.htm>.

Appel G, Reus M. *Formulações aplicadas à Odontologia*. 2 ed. São Paulo: RCN. Editora; 2005.

Armitage GC. Development of a classification system for periodontal diseases and conditions. *Ann Periodontol*. 1999; 4(1):1-6.

Asokan S, Emmadi P, Chamundeswari R. Effect of oil pulling on plaque induced gingivitis: a randomized, controlled, triple-blind study. *Indian J Dent Res*. 2009; 20(1):47-51.

Asolini FC, Tedesco AM, Carpes ST, Ferraz C, Alencar SM. Atividade antioxidante e antibacteriana dos compostos fenólicos dos extratos de plantas usadas como chás. *Braz J Food Technol*. 2006; 9(3):209-15.

Axelsson P, Nystrom B, Lindhe J. The long-term effect of a plaque control program on tooth mortality, caries and periodontal disease in adults. Results after 30 years of maintenance. *J Clin Periodontol*. 2004; 31(9):749-57.

*De acordo com a norma da UNICAMP/FOP, baseada na norma do International Committee of Medical Journal Editors – Grupo Vancouver. Abreviatura dos periódicos em conformidade com o Medline.

- Bashir A, Hamburger M, Gupta MP, Solis PN, Hostettmann K. Flavonol glycosides from *Monnina sylvatica*. *Phytochemistry*. 1991; 30(11):3781-4.
- Baumgartner S, Imfeld T, Schicht O, Rath C, Persson RE, Persson GR. The impact of the stone age diet on gingival conditions in the absence of oral hygiene. *J Periodontol*. 2009; 80(5):759-68.
- Bernimoulin JP. Recent concepts in plaque formation. *J Clin Periodontol*. 2003; 30 Suppl 5:7-9.
- Billeter M, Meier B, Sticher O. 8-Hydroxyflavonoid glucosides from *Malva sylvestris*. *J Phytochem*. 1990; 8:464-9.
- Borba AM, Macedo M. Plantas medicinais usadas para a saúde bucal pela comunidade do bairro Santa Cruz, Chapada dos Guimarães, MT, Brasil. *Acta Bot Bras*. 2006; 20(4):771-782.
- Bruneton J. *Elementos de Fitoquímica y Farmacognosia*. 1 ed. Barcelona: Editorial Acribia; 1991.
- Burka LT, Kuhnert L. Biosynthesis of furanosesquiterpenoid stress metabolites in sweet potatoes (*Ipomoea batatas*). Oxidation of ipomeamarone to 4-hydroxymyoporone. *Phytochemistry*. 1997; 16(12):2022-3.
- Carballo JL, Hernandez-Inda ZL, Perez P, Garcia-Gravalos MD. A comparison between two brine shrimp assays to detect in vitro cytotoxicity in marine natural products. *BMC Biotechnol*. 2002; 2:17.
- Cardoso AD, Viana AES, Ramos PAS, Matsumoto SN, Amaral CLF, Sedyama T, et al. Avaliação de clones de batata-doce em Vitória da Conquista. *Hortic Bras*. 2005; 23:911-4.
- Carvalho ACB, Balbino EE, Maciel A, Perfeito JPS. Situação do registro de medicamentos fitoterápicos no Brasil. *Braz J Pharmacogn*. 2008; 18(2):314-9.

Cechinel Filho V, Yunes RA. Estratégias para a obtenção de compostos farmacologicamente ativos a partir de plantas medicinais. Conceitos sobre a modificação estrutural para a otimização da atividade. *Quim Nova*. 1998; 21(1):99-105.

Chang WH, Chen CM, Hu SP, Kan NW, Chiu CC, Liu JF. Effect of purple sweet potato leaf consumption on the modulation of the antioxidative status in basketball players during training. *Asia Pac J Clin Nutr*. 2007; 16(3):455-61.

Charles CH, Sharma NC, Galustians HJ, Qaqish J, McGuire JA, Vincent JW. Comparative efficacy of an antiseptic mouthrinse and an antiplaque/antigingivitis dentifrice. A six-month clinical trial. *J Am Dent Assoc*. 2001; 132(5):670-5.

Chen YC, Siems WF, Pearce G, Ryan CA. Six peptide wound signals derived from a single precursor protein in *Ipomoea batatas* leaves activate the expression of the defense gene sporamin. *J Biol Chem*. 2008; 283(17):11469-76.

Ciancio S. Improving oral health: current considerations. *J Clin Periodontol*. 2003; 30 Suppl 5:4-6.

CIP Centro Internacional de la Papa. La batata em cifras: producción, utilización, consumo e alimentación. 2010 [acesso 15 de agosto de 2010]. Disponível em: <http://www.cipotato.org/sweetpotato/facts/batacif.pdf>.

Dale MM. *Textbook of immunopharmacology*. 3 ed. London Blackwell; 1994.

De Siqueira JM, Ziminiani MG, Resende UM, Boaventura MAD. Estudo fitoquímico das cascas do caule de *Duguetia glabriuscula* - Annonaceae, biomonitorado pelo ensaio de toxicidade frente a *Artemia salina* leach. *Quim Nova*. 2001; 24(2):185-187.

De Young LM, Kheifets JB, Ballaron SJ, Young JM. Edema and cell infiltration in the phorbol ester-treated mouse ear are temporally separate and can be differentially modulated by pharmacologic agents. *Agents Actions*. 1989; 26(3-4):335-41.

Deinzer R, Weik U, Kolb-Bachofen V, Herforth A. Comparison of experimental gingivitis with persistent gingivitis: differences in clinical parameters and cytokine concentrations. *J Periodontol Res.* 2007; 42(4):318-24.

Delima AJ, Van Dyke TE. Origin and function of the cellular components in gingival crevice fluid. *Periodontol 2000.* 2003; 31:55-76.

Dini I, Tenore GC, Dini A. Saponins in *Ipomoea batatas* tubers: Isolation, characterization, quantification and antioxidant properties. *Food Chem.* 2009; 113(2):411-9.

Drumond MRS, Castro RD, Almeida RVD, Pereira MSV, Padilha WWN. Estudo comparativo in vitro da atividade antibacteriana de produtos fitoterápicos sobre bactérias cariogênicas. *Pesq Bras Odontoped Clin Integr.* 2006; 4(1):33-8.

Evans WC. Trease and evans' pharmacognosy. 16th ed. London: Sauders Elsevier; 2009.

Falkenberg MB, Santos RI, Simões CMO. Introdução à análise fitoquímica. In: Simoes CMO, Schenkel G, Gosmann G, de Mello JCP, Mentz LA, Petrovick PR, editors. *Farmacognosia: da planta ao medicamento 6ed.* Porto Alegre: UFRGS; 2007. p. 163-79.

Farmacopéia Brasileira IV. 4 ed. São Paulo: Atheneu; 1988.

Farsam H, Amanlou M, Reza Dehpour A, Jahaniani F. Anti-inflammatory and analgesic activity of *Biebersteinia multifida* DC. root extract. *J Ethnopharmacol.* 2000; 71(3):443-7.

Ferreira AO, Brandão M. *Guia prático da farmácia magistral.* 3 ed. São Paulo: Pharmabooks; 2008.

Gàbor M. Models of acute inflammation in the ear. Winyard PG, Willoughby DA, editors. *New Jersey: Humana Press; 2003.*

Gaffar A, Afflitto J, Nabi N. Chemical agents for the control of plaque and plaque microflora: an overview. *Eur J Oral Sci.* 1997; 105(5 Pt 2):502-7.

Goodson JM. Gingival crevice fluid flow. *Periodontol 2000.* 2003; 31:43-54.

Groppo FC, Bergamaschi Cde C, Cogo K, Franz-Montan M, Motta RH, de Andrade ED. Use of phytotherapy in dentistry. *Phytother Res.* 2008; 22(8):993-8.

Groppo FC, Ramacciato JC, Motta RH, Ferraresi PM, Sartoratto A. Antimicrobial activity of garlic against oral streptococci. *Int J Dent Hyg.* 2007; 5(2):109-15.

Groppo FC, Ramacciato JC, Simoes RP, Florio FM, Sartoratto A. Antimicrobial activity of garlic, tea tree oil, and chlorhexidine against oral microorganisms. *Int Dent J.* 2002; 52(6):433-7.

Haffajee AD, Socransky SS. Microbiology of periodontal diseases: introduction. *Periodontol 2000.* 2005; 38:9-12.

Hagiwara A, Yoshino H, Ichihara T, Kawabe M, Tamano S, Aoki H, et al. Prevention by natural food anthocyanins, purple sweet potato color and red cabbage color, of 2-amino-1-methyl-6-phenylimidazo[4,5-b]pyridine (PhIP)-associated colorectal carcinogenesis in rats initiated with 1,2-dimethylhydrazine. *J Toxicol Sci.* 2002; 27(1):57-68.

Hecker E, Schmidt R. Phorbolsters--the irritants and cocarcinogens of *Croton Tiglium* L. *Fortschr Chem Org Naturst.* 1974; 31:377-467.

Herrera BS, Mendes GIAC, Porto RM, Rigato HM, Moreira LD, Muscará MN, et al. O papel da clorexidina no tratamento de pacientes com gengivite no distrito de São Carlos do Jamari - RO. *Rev Periodontia.* 2007; 17(4):60-4.

Hsu CL, Chen W, Weng YM, Tseng CY. Chemical composition, physical properties, and antioxidant activities of yam flours as affected by different drying methods. *Food Chem.* 2003; 83(1):85-92.

Iauk L, Bue A, Milazzo I, Rapisarda A, Blandino G. Antibacterial activity of medicinal plant extracts against periodontopathic bacteria. *Phytother Res.* 2003; 17(6):599-604.

International pharmacopoeia. 4th ed. Geneva: World Health Organization; 2006.

- Kahl R. Protective and adverse biological actions of phenolic antioxidants. In: Sies H, editor. Oxidative Stress: oxidants and antioxidants. London: Academic Press; 1991. p. 245–73.
- Kantarci A, Hasturk H, Van Dyke TE. Host-mediated resolution of inflammation in periodontal diseases. *Periodontol 2000*. 2006; 40:144-63.
- Khan MS, Nema N, M.D. K, Khanam S. Chromatographic estimation of maturity based phytochemical profiling of *Ipomoea mauritiana*. *Int J Phytomed*. 2009; 1(1):22-30.
- Kinane DF. Causation and pathogenesis of periodontal disease. *Periodontol 2000*. 2001; 25:8-20.
- Kinsella JE, Frankel E, German B, Kanner J. Possible mechanisms for the protective role of antioxidants in wine and plant foods *Food Technol*. 1993; 47(4):85-9.
- Kolenbrander PE, Palmer RJ, Jr., Rickard AH, Jakubovics NS, Chalmers NI, Diaz PI. Bacterial interactions and successions during plaque development. *Periodontol 2000*. 2006; 42:47-79.
- Konczak-Islam I, Yoshimoto M, Hou DX, Terahara N, Yamakawa O. Potential chemopreventive properties of anthocyanin-rich aqueous extracts from in vitro produced tissue of sweetpotato (*Ipomoea batatas* L.). *J Agric Food Chem*. 2003; 51(20):5916-22.
- Kuru L, Parkar MH, Griffiths GS, Newman HN, Olsen I. Flow cytometry analysis of gingival and periodontal ligament cells. *J Dent Res*. 1998; 77(4):555-64.
- Kusano S, Abe H, Tamura H. Isolation of antidiabetic components from white-skinned sweet potato (*Ipomoea batatas* L.). *Biosci Biotechnol Biochem*. 2001; 65(1):109-14.
- Kuster RM, Rocha LM. Cumarinas, cromonas e xantonas. In: Simoes CMO, Schenkel G, Gosmann G, de Mello JCP, Mentz LA, Petrovick PR, editors. *Farmacognosia: da planta ao medicamento 6ed*. Porto Alegre: UFRGS; 2007. p. 121-34.

Laufer Neto J, Jansen JL, Farago PV, Santos FA. Avaliação físico-química e microbiológica de gel termossensível a base de lidocaína e prilocaína para anestesia periodontal Arq odontol. 2006; 42(3):229-40.

Lima AR, Barbosa VC, Santos Filho PR, Gouvêa CMCP. Avaliação in vitro da atividade antioxidante do extrato hidroalcoólico de folhas de bardana. Rev Bras Farmacogn. 2006; 16(4):531-6.

Lima Jr. JF, Vieira LB, Leite MJVF, Lima KC. O uso de fitoterápicos e a saúde bucal. Saude Rev. 2005; 7(16):11-7.

Locher CP, Burch MT, Mower HF, Berestecky J, Davis H, Van Poel B, et al. Anti-microbial activity and anti-complement activity of extracts obtained from selected Hawaiian medicinal plants. J Ethnopharmacol. 1995; 49(1):23-32.

Löe H, Theilade E, Jensen SB. Experimental Gingivitis in Man. J Periodontol. 1965; 36:177-87.

Lorenzi H, Matos FJA. Plantas medicinais no Brasil: nativas e exóticas. 2 ed. São Paulo: Plantarum; 2008.

Marchese JA, Broetto F, Ming LC, Goto R, Stefanini MB, Galina A, et al. Perfil dos consumidores de plantas medicinais e condimentares do município de Pato Branco (PR). Horti Bras. 2004; 22(2):332-5.

Marinho BVS, Araújo ACS. O uso dos enxaguatórios bucais sobre a gengivite e o biofilme dental. Int J Dent. 2007; 6(4):124-31.

Markert A, Steffan N, Ploss K, Hellwig S, Steiner U, Drewke C, et al. Biosynthesis and accumulation of ergoline alkaloids in a mutualistic association between *Ipomoea asarifolia* (Convolvulaceae) and a clavicipitalean fungus. Plant Physiol. 2008; 147(1):296-305.

Martins ER, Castro DM, Castellani DC, Dias JE. Plantas medicinais. Viçosa: Universidade Federal de Viçosa; 2000.

Medeiros MFT, Fonseca VS, Andreato RHP. Plantas medicinais e seus usos pelos sítiantes da Reserva Rio das Pedras, Mangaratiba, RJ, Brasil. *Acta Bot Bras.* 2004; 18(2):391-9.

Meyer B, Ferrigni N, Putnam J, Jacobsen L, Nichols D, McLaughlin J. Brine shrimp: a convenient general bioassay for active plant constituents. *Planta Med.* 1982; 45(1):31-4.

Miyazaki K, Makino K, Iwadate E, Deguchi Y, Ishikawa F. Anthocyanins from purple sweet potato *Ipomoea batatas* cultivar Ayamurasaki suppress the development of atherosclerotic lesions and both enhancements of oxidative stress and soluble vascular cell adhesion molecule-1 in apolipoprotein E-deficient mice. *J Agric Food Chem.* 2008; 56(23):11485-92.

Mombelli A, van Oosten MA, Schurch E, Jr., Land NP. The microbiota associated with successful or failing osseointegrated titanium implants. *Oral Microbiol Immunol.* 1987; 2(4):145-51.

Moran JM. Home-use oral hygiene products: mouthrinses. *Periodontol 2000.* 2008; 48:42-53.

Mors WB, Rizzini CT, Pereira NA. *Medicinal plants of Brazil.* Algonac: Reference Publishing Inc.; 2000.

Nakashima T. Étude phitochimique, evaluation des activités antifongiques et antivirales de trios Verbenaceae: *Lippia alba* N.E. Brown, *Lippia multiflora* Mold. *Citharexylum myrianthum* Cham [Tese]. Toulouse: Institut National Polytechnique de Toulouse; 1993.

Nascimento J, Melo A, Lima e Silva T, Veras Filho J, Santos E, Albuquerque U, et al. Estudo fitoquímico e bioensaio toxicológico frente a larvas de *Artemia salina* Leach. de três espécies medicinais do gênero *Phyllanthus* (Phyllanthaceae). *Rev Ciênc Farm Básica Apl.* 2009; 29(2):145-150.

NCCLS. *Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria That Grow Aerobically; Approved Standard, M7-A6 (2003).*

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

Oliveira FQ, Gobira B, Guimarães C, Batista J, Barreto M, Souza M. Espécies vegetais indicadas na Odontologia. Rev Bras Farmacogn. 2007; 17(3):466-76.

Pannuti CM, Mattos JP, Ranoya PN, Jesus AM, Lotufo RF, Romito GA. Clinical effect of a herbal dentifrice on the control of plaque and gingivitis: a double-blind study. Pesqui Odontol Bras. 2003; 17(4):314-8.

Pelczar JR, Chan ECS, Krieg NR. Microbiologia: conceitos e aplicações. 2 ed. São Paulo: Makron Books; 1996.

Pereira JV, Pereira MSV, Higino JS, Sampaio FC, Alves PM, Araújo CRF. Estudos com o extrato da *Punica granatum Linn.*(romã): Efeito antimicrobiano in vitro e avaliação clínica de um dentifrício sobre microrganismos do biofilme dental Rev Odont Ciênc. 2005; 20(49):262-9.

Perez AC, Hakumata LY. Efeito antiinflamatório da folha de batata-doce (*Ipomoea batatas*). Rev Odontol UNESP. 1999; 28(1):161-5.

Perusquia M, Mendoza S, Bye R, Linares E, Mata R. Vasoactive effects of aqueous extracts from five Mexican medicinal plants on isolated rat aorta. J Ethnopharmacol. 1995; 46(1):63-9.

Phillipson JD. New drugs from nature--it could be yew. Phytother Res. 1999; 13(1):2-8.

Philpott M, Ferguson LR, Gould KS, Harris PJ. Anthocyanidin-containing compounds occur in the periderm cell walls of the storage roots of sweet potato (*Ipomoea batatas*). J Plant Physiol. 2009; 166(10):1112-7.

Pinto TJA, Kaneko TM, Ohara MT. Controle biológico de qualidade de produtos farmacêuticos, correlatos e cosméticos. 2 ed. Rio de Janeiro: Atheneu; 2003.

Poser GL, Mentz LA. Diversidade Biológica e Sistemas de Classificação. In: Simões CMO, Schenkel EP, Gosmann G, Mello JCPd, Mentz LA, Petrovick PR, editors. Farmacognosia: da planta ao medicamento. 6 ed. Porto Alegre/Florianópolis: Editora da UFRGS/Editora da UFSC; 2007. p. 75-89.

Preshaw PM. Host response modulation in periodontics. *Periodontol* 2000. 2008; 48:92-110.

Prieto P, Pineda M, Aguilar M. Spectrophotometric quantitation of antioxidant capacity through the formation of a phosphomolybdenum complex: specific application to the determination of vitamin E. *Anal Biochem*. 1999; 269(2):337-41.

Redzic S, Hodzic N, Tuka M. Plant pigments (antioxidants) of medicinal plants *Malva silvestris* L. and *Malva moschata* L. (Malvaceae). *Bosn J Basic Med Sci*. 2005; 5(2):53-8.

Reynolds WF, Yu M, Enriquez RG, Gonzalez H, Leon I, Magos G, et al. Isolation and characterization of cytotoxic and antibacterial tetrasaccharide glycosides from *Ipomoea stans*. *J Nat Prod*. 1995; 58(11):1730-4.

Salgado AD, Maia JL, Pereira SL, de Lemos TL, Mota OM. Antiplaque and antigingivitis effects of a gel containing *Punica granatum* Linn extract: a double-blind clinical study in humans. *J Appl Oral Sci*. 2006; 14(3):162-6.

Samy RP, Gopalakrishnakone P. Therapeutic potential of plants as anti-microbials for drug discovery. *Evid Based Complement Alternat Med*. 2010; 7(3):283-94.

Santos SC, de Mello JCP. Taninos. In: Simoes CMO, Schenkel G, Gosmann G, de Mello JCP, Mentz LA, Petrovick PR, editors. Farmacognosia: da planta ao medicamento 6ed. Porto Alegre: UFRGS; 2007. p. 615-56.

Schenkel EP, Gosmann G, Athayde ML. Saponinas. In: Simoes CMO, Schenkel G, Gosmann G, de Mello JCP, Mentz LA, Petrovick PR, editors. Farmacognosia: da planta ao medicamento 6ed. Porto Alegre: UFRGS; 2007. p. 711-40.

Schiffner U, Bahr M, Effenberger S. Plaque and gingivitis in the elderly: a randomized, single-blind clinical trial on the outcome of intensified mechanical or antibacterial oral hygiene measures. *J Clin Periodontol*. 2007; 34(12):1068-73.

Shih M, Kuo C, Chiang W. Effects of drying and extrusion on colour, chemical composition, antioxidant activities and mitogenic response of spleen lymphocytes of sweet potatoes. *Food Chem*. 2009; 117(1):114-21.

Silness J, Loe H. Periodontal Disease in Pregnancy. II. Correlation between Oral Hygiene and Periodontal Condition. *Acta Odontol Scand*. 1964; 22:121-35.

Silness J, Loe H. Periodontal Disease in Pregnancy. II. Correlation between oral hygiene and periodontal condition. *Acta Odontol Scand*. 1964; 22:121-35.

Silva JBC, Lopes CA, Magalhães JS. Cultura da batata doce. 2004 [acesso 15 de agosto de 2010]. Disponível em: <http://www.cnph.embrapa.br/sistprod/batatadoce/index.htm>.

Silva NB, Claudino LV, Neves AS, Costa AC, Valença AMG. Avaliação da atividade antimicrobiana de tinturas fitoterápicas sobre porphyromonas gingivales e prevotella melaninogênica. *Pesqu Bras Odontoped Clin Integr*. 2006; 6(2):167-71.

Singleton VL, Orthofer R, Lamuela-Raventós RM. Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of Folin-Ciocalteu reagent. *Methods Enzymol*. 1999; 299:152-78.

Soares DGS, Oliveira CB, Leal C, Drumond MRS, Padilha WWN. Susceptibilidade in vitro de bactérias bucais a tinturas fitoterápicas. *Rev Odont Ciênc*. 2006; 21(53):232-7.

Socransky SS, Haffajee AD. Periodontal microbial ecology. *Periodontol 2000*. 2005; 38:135-87.

Solis PN, Wright CW, Anderson MM, Gupta MP, Phillipson JD. A microwell cytotoxicity assay using *Artemia salina* (brine shrimp). *Planta Med*. 1993; 59(3):250-2.

Strohl WR. The role of natural products in a modern drug discovery program. *Drug Discov Today*. 2000; 5(2):39-41.

Suda I, Furuta S, Nishiba Y, Yamakawa O, Matsugano K, Sugita K. Reduction of liver injury induced by carbon tetrachloride in rats administered purple-colored sweetpotato juice. *Nippon Shokuhin Kagaku Kogaku Kaishi*. 1997; 44(4):315-8.

Suppipat N. Evaluation of an electronic device for gingival fluid quantitation. *J Periodontol*. 1977; 48(7):388-94.

Suzuki T, Tada H, Sato E, Sagae Y. Application of sweet potato fiber to skin wound in rat. *Biol Pharm Bull*. 1996; 19(7):977-83.

Tada H, Shiho O, Kuroshima K, Koyama M, Tsukamoto K. An improved colorimetric assay for interleukin 2. *J Immunol Methods*. 1986; 93(2):157-65.

Taiz L, Zeiger E. *Plant physiology*. Redwood City: Benjamin/Cummings Publishing Company; 1991.

Tatakis DN, Trombelli L. Modulation of clinical expression of plaque-induced gingivitis. I. Background review and rationale. *J Clin Periodontol*. 2004; 31(4):229-38.

Thibodeau MS, Poore MH, Hagler WM, Jr., Rogers GM. Effect of fermentation on Sweetpotato (*Ipomoea batatas*) toxicity in mice. *J Agric Food Chem*. 2004; 52(2):380-4.

Thompson JE. *A practical guide to contemporary pharmacy practice*. 2 ed. Baltimore: Lippincott, Williams and Wilkins; 1998.

Trombelli L, Farina R, Minenna L, Carrieri A, Scapoli C, Tatakis DN. Experimental gingivitis: reproducibility of plaque accumulation and gingival inflammation parameters in selected populations during a repeat trial. *J Clin Periodontol*. 2008; 35(11):955-60.

van der Weijden GA, Hioe KP. A systematic review of the effectiveness of self-performed mechanical plaque removal in adults with gingivitis using a manual toothbrush. *J Clin Periodontol.* 2005; 32 Suppl 6:214-28.

Van der Weijden GA, Timmerman MF, Nijboer A, Reijerse E, Van der Velden U. Comparison of different approaches to assess bleeding on probing as indicators of gingivitis. *J Clin Periodontol.* 1994; 21(9):589-94.

Velloso A, Baeza M, Tornero P, Herrero T, Fernández M, Rubio M, et al. Anaphylaxis caused by *Ipomoea batatas*. *J Allergy Clin Immunol.* 2004; 113(2):S242.

Verpoorte R. Pharmacognosy in the new millennium: leadfinding and biotechnology. *J Pharm Pharmacol.* 2000; 52(3):253-62.

Wang YJ, Zheng YL, Lu J, Chen GQ, Wang XH, Feng J, et al. Purple sweet potato color suppresses lipopolysaccharide-induced acute inflammatory response in mouse brain. *Neurochem Int.* 2010; 56(3):424-30.

Williamson EM, Okpako DT, Evans FJ. Pharmacological methods in phytotherapy research, selection, preparation and pharmacological evaluation of plant material. Chichester: John Wiley; 1996.

Yates RJ, Shearer BH, Morgan R, Addy M. A modification to the experimental gingivitis protocol to compare the antiplaque properties of two toothpastes. *J Clin Periodontol.* 2003; 30(2):119-24.

Yeh KW, Chen JC, Lin MI, Chen YM, Lin CY. Functional activity of sporamin from sweet potato (*Ipomoea batatas* Lam.): a tuber storage protein with trypsin inhibitory activity. *Plant Mol Biol.* 1997; 33(3):565-70.

Yuan S, Zhao Y, You Y. Alkaloids of the hairy roots of *Ipomoea batatas* Lam. *Yao Xue Xue Bao.* 2004; 39(10):818-20.

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

Zheng W, Clifford MN. Profiling the chlorogenic acids of sweet potato (*Ipomoea batatas*) from China. *Food Chem*. 2008; 106(1):147-52.

Zuanazzi JAS, Montanha JA. Flavonóides. In: Simoes CMO, Schenkel G, Gosmann G, de Mello JCP, Mentz LA, Petrovick PR, editors. *Farmacognosia: da planta ao medicamento* 6ed. Porto Alegre: UFRGS; 2007. p. 577-614.

ANEXO

1 Parecer comissão de ética



PARECER Nº 19/2008
Protocolo: 06497/08

Nesta data, a Comissão de Ética em Pesquisa, **APROVOU** o protocolo de pesquisa intitulado "**Estudo dos efeitos da Ipomoea batatas L na resposta inflamatório e no biofilme dental**", tendo como responsáveis os pesquisadores: Márcia Tháís Pochapski (FOP/UNICAMP), Francisco Carlos Groppo (FOP/UNICAMP), Michel Fleith Otuki (UEPG), Elizabete Brasil dos Santos (UEPG) e Fábio André dos Santos (UEPG).

Ponta Grossa, 10 de junho de 2008.

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE PONTA GROSSA
COMISSÃO DE ÉTICA EM PESQUISA - COEP


Prof. MSc. Marlene Harger Zimmermann
Coordenadora

Av. Carlos Cavalcanti, 4748 - CEP: 84030-900 - Ponta Grossa - PR - BRASIL
Bloco M Sala: 12 - Campus Universitário em Uvaíras
Fone: (41) 3220-3108 - Fax: (41) 3220-3102
e-mail: seccoes@uepg.br Home page: www.uepg.br

2 Ficha clínica confeccionada para o estudo

FICHA DE PESQUISA

N^o:

Nome:							Sexo:			
Endereço:										
Cidade:			U.F.:		CEP:		Fone:			
Data de Nascimento			Idade:		Estado civil		Profissão:			
ANAMNESE - HISTÓRICO					DATA:		SIM		NÃO	
					/ /					
1.	Está ou esteve em tratamento médico nos últimos 6 meses?									
2.	Faz ou fez uso contínuo de algum medicamento nos últimos 6 meses?									
3.	Quais?									
4.	Algum tipo de alergia?									
5.	Quais?									
6.	Alguma doença sistêmica?									
7.	Quais?									
8.	Hipertensão?									
9.	Grávida?									
10.	Usa anticoncepcionais?									
11.	Fumante?									
12.	Fez algum tratamento Odontológico nos últimos 6 meses?									
13.	Motivo?									
14.	N. de vezes que escova os dentes por dia?	1 ()	2 ()	3 ()	4 ()	5 ()	+ de 5 ()			
15.	Tipo de escova?	Dura ()			Média ()		Macia ()			
16.	Técnica de escovação?	Horizontal ()		Bass ()		Stillman ()		Fones ()	Outra ()	
17.	Usa o fio dental?									
18.	N. de vezes que usa o fio dental por dia?	Nenhuma ()	As vezes ()	1 ()	2 ()	3 ()	4 ()	5 ()	+ de 5 ()	
19.	Usa creme dental?									
20.	Usa alguma solução para bochecho?									
21.	Qual?									
22.	Usa algum outro meio auxiliar para higienização bucal									
23.	Quais?									
OBSERVAÇÕES:										

PRIMEIRA ETAPA

I	F	Índice de Placa - / / /							Tratamento:	
DENTE		17	16	15	14	24	25	26	27	
IPI	V									
	L									
DENTE		47	46	45	44	34	35	36	37	
IPI	V									
	L									

I	F	Índice de Placa - / / /							Tratamento:	
DENTE		17	16	15	14	24	25	26	27	
IPI	V									
	L									
DENTE		47	46	45	44	34	35	36	37	
IPI	V									
	L									

I	F	Índice de Gengival - / / /							Tratamento:	
DENTE		17	16	15	14	24	25	26	27	
IPI	V									
	L									
DENTE		47	46	45	44	34	35	36	37	
IPI	V									
	L									

I	F	Índice de Gengival - / / /							Tratamento:	
DENTE		17	16	15	14	24	25	26	27	
IPI	V									
	L									
DENTE		47	46	45	44	34	35	36	37	
IPI	V									
	L									

I	F	Coleta de Fluido - / / /							Tratamento:	
DENTE		17	16	15	14	24	25	26	27	
IPI	V									
	L									
DENTE		47	46	45	44	34	35	36	37	
IPI	V									
	L									

I	F	Coleta de Fluido - / / /							Tratamento:	
DENTE		17	16	15	14	24	25	26	27	
IPI	V									
	L									
DENTE		47	46	45	44	34	35	36	37	
IPI	V									
	L									

I	F	Coleta de Biofilme - / / /							Tratamento:	
DENTE		17	16	15	14	24	25	26	27	
IPI	V									
	L									
DENTE		47	46	45	44	34	35	36	37	
IPI	V									
	L									

I	F	Coleta de Biofilme - / / /							Tratamento:	
DENTE		17	16	15	14	24	25	26	27	
IPI	V									
	L									
DENTE		47	46	45	44	34	35	36	37	
IPI	V									
	L									

SEGUNDA ETAPA

I	F	Índice de Placa - / /					Tratamento:		
DENTE		17	16	15	14	24	25	26	27
IPI.	V								
	L								
DENTE		47	46	45	44	34	35	36	37
IPI.	V								
	L								

I	F	Índice de Placa - / /					Tratamento:		
DENTE		17	16	15	14	24	25	26	27
IPI.	V								
	L								
DENTE		47	46	45	44	34	35	36	37
IPI.	V								
	L								

I	F	Índice de Gengival - / /					Tratamento:		
DENTE		17	16	15	14	24	25	26	27
IPI.	V								
	L								
DENTE		47	46	45	44	34	35	36	37
IPI.	V								
	L								

I	F	Índice de Gengival - / /					Tratamento:		
DENTE		17	16	15	14	24	25	26	27
IPI.	V								
	L								
DENTE		47	46	45	44	34	35	36	37
IPI.	V								
	L								

I	F	Coleta de Fluido - / /					Tratamento:		
DENTE		17	16	15	14	24	25	26	27
IPI.	V								
	L								
DENTE		47	46	45	44	34	35	36	37
IPI.	V								
	L								

I	F	Coleta de Fluido - / /					Tratamento:		
DENTE		17	16	15	14	24	25	26	27
IPI.	V								
	L								
DENTE		47	46	45	44	34	35	36	37
IPI.	V								
	L								

I	F	Coleta de Biofilme - / /					Tratamento:		
DENTE		17	16	15	14	24	25	26	27
IPI.	V								
	L								
DENTE		47	46	45	44	34	35	36	37
IPI.	V								
	L								

I	F	Coleta de Biofilme - / /					Tratamento:		
DENTE		17	16	15	14	24	25	26	27
IPI.	V								
	L								
DENTE		47	46	45	44	34	35	36	37
IPI.	V								
	L								

TERCEIRA ETAPA

I	F	Índice de Placa - / /					Tratamento:		
DENTE		17	16	15	14	24	25	26	27
IPI.	V								
	L								
DENTE		47	46	45	44	34	35	36	37
IPI.	V								
	L								

I	F	Índice de Placa - / /					Tratamento:		
DENTE		17	16	15	14	24	25	26	27
IPI.	V								
	L								
DENTE		47	46	45	44	34	35	36	37
IPI.	V								
	L								

I	F	Índice de Gengival - / /					Tratamento:		
DENTE		17	16	15	14	24	25	26	27
IPI.	V								
	L								
DENTE		47	46	45	44	34	35	36	37
IPI.	V								
	L								

I	F	Índice de Gengival - / /					Tratamento:		
DENTE		17	16	15	14	24	25	26	27
IPI.	V								
	L								
DENTE		47	46	45	44	34	35	36	37
IPI.	V								
	L								

I	F	Coleta de Fluido - / /					Tratamento:		
DENTE		17	16	15	14	24	25	26	27
IPI.	V								
	L								
DENTE		47	46	45	44	34	35	36	37
IPI.	V								
	L								

I	F	Coleta de Fluido - / /					Tratamento:		
DENTE		17	16	15	14	24	25	26	27
IPI.	V								
	L								
DENTE		47	46	45	44	34	35	36	37
IPI.	V								
	L								

I	F	Coleta de Biofilme - / /					Tratamento:		
DENTE		17	16	15	14	24	25	26	27
IPI.	V								
	L								
DENTE		47	46	45	44	34	35	36	37
IPI.	V								
	L								

I	F	Coleta de Biofilme - / /					Tratamento:		
DENTE		17	16	15	14	24	25	26	27
IPI.	V								
	L								
DENTE		47	46	45	44	34	35	36	37
IPI.	V								
	L								

DATA	PROCEDIMENTO OPERATÓRIO