

Desenvolvimento de dentifrícios com extratos fluidos de *Calendula officinalis* L. (Asteraceae) e *Casearia sylvestris* Sw. (Flacourtiaceae) destinado ao combate à placa bacteriana*

Dentifrice development with fluid extracts of *Calendula officinalis* L. (Asteraceae) and *Casearia sylvestris* Sw. (Flacourtiaceae) for the bacterial plaque

Angela Bonjorno Arantes; Marisa Moura de Souza Luz; Cid Aimbiré de Moraes Santos & Mayumi Eliza Otsuka Sato

RESUMO – A *Calendula officinalis* L. (Asteraceae) e a *Casearia sylvestris* Sw. (Flacourtiaceae), são exemplares da flora medicinal com propriedades terapêuticas, destacando-se a antiinflamatória, antimicrobiana e cicatrizante. No intuito de usufruir destas propriedades desenvolveu-se dentifrício, com matérias-primas e excipientes que atendessem os requisitos farmacotécnicos e as restrições legislativas, incorporando-se 10% dos extratos fluidos (EF) destas plantas. Formulou-se dentifrícios com as designações CO (EF de *Calendula officinalis*); CS (EF de *Casearia sylvestris*); CC (EF de *Calendula officinalis* e EF de *Casearia sylvestris*), avaliando-se a capacidade inibitória *in vitro* frente a microorganismos específicos do processo de formação de placa bacteriana, *Streptococcus mutans* (ATCC 25175) e os frequentemente encontrados em quadros de infecções orais, *Staphylococcus aureus* (ATCC 85358) e *Candida albicans* (ATCC 10231). Empregou-se o método proposto pela FIOCRUZ/INCQS (1992) para a avaliação da atividade inibitória, de preparações na forma sólida, semi-sólida e líquida. Os resultados foram caracterizados pelo aparecimento de um halo de inibição, zona clara ao redor da preparação, verificando-se este nos dentifrícios CO e CC frente ao *Streptococcus mutans*; nos dentifrícios CO, CS e CC para o *Staphylococcus aureus* e em CS e CC frente a *Candida albicans*, justificando a associação dos extratos fluidos de *Calendula officinalis* e *Casearia sylvestris* propostos na formulação CC, como inibidores de microorganismos frequentemente encontrados em placa bacteriana.

PALAVRAS-CHAVE – Placa bacteriana, dentifrício, *Calendula officinalis*, *Casearia sylvestris*, antimicrobiano.

SUMMARY – *Calendula officinalis* L. (Asteraceae) and *Casearia sylvestris* Sw. (Flacourtiaceae) are both examples of the medicinal flora that have therapeutical properties mainly antiinflammatory, antimicrobial and tissue repair. Intend to use these benefits, was developed a dentifrice, with a criterial selection of the raw materials and excipients that would attend pharmacotechnical requirements and legislative restrictions, incorporating 10% fluid extracts fluid extracts (EF) of these plants. Were made CO (EF C. officinalis); CS (EF C. sylvestris); and CC (EF C. officinalis and EF C. sylvestris) dentifrices and CC. With these formulations, the inhibitory capacity against microorganisms specifically found in the bacteria plaque formation process, *Streptococcus mutans* (ATCC 25175) and the commonly found in oral infection cases, *Staphylococcus aureus* (ATCC 8538) and *Candida albicans* (ATCC 10231), applying the method proposed by FIOCRUZ/INCQS (1992) to evaluate the inhibitory capacity in solid, semisolid and liquid preparations. The results were characterized by the appearing that inhibition zone, a light zone surrounding the preparation, in toothpaste CO and CC when in contact with *Streptococcus mutans*, dentifrices CO, CS and CC in contact with *Staphylococcus aureus* and in CS and CC when in contact with *Candida albicans*, justifying the association of the fluid extracts in the proposed formulation CC against microorganisms presents in bacterial plaque.

KEYWORDS – Bacterial plaque, toothpaste, *Calendula officinalis*, *Casearia sylvestris*, antimicrobial.

INTRODUÇÃO

Os meios para o controle e prevenção das patologias bucais incluem a eliminação da placa bacteriana detectável clinicamente, evitar a adesão dos mesmos à superfície dentária e conseqüentemente, impedir a formação da película de aderência, além do combate de forma seletiva espécies consideradas patogênicas, Burnet *et al.* (1991).

A rápida evolução e conscientização da cárie, gengivite e periodontite para a condição de doença, promoveram um grande impacto no setor de dentifrícios, trazendo novas responsabilidades e desafios às indústrias, na busca por alternativas terapêuticas, Saxer *et al.* (1994); Saxer *et al.* (1995).

Concentradas nestes objetivos as indústrias tem procurado associar em um único produto uma série de substâncias com atividades específicas e correlatas an-

Recebido em 09/10/2004

* Departamento de Farmácia, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, Paraná, Brasil.

tiplaca, antiinflamatória, anti-séptica, antitártaro, associadas à ação abrasiva dos mesmos.

Newbrun (1990) destaca duas formas de controle da placa bacteriana: o mecânico, por meio da escovação e do uso do fio dental e o químico, com finalidade terapêutica e profilática. A terapêutica para manter um equilíbrio ecológico entre a microbiota não cariogênica e a patogênica, e a profilática, para minimizar a quantidade e a velocidade de formação da placa bacteriana.

Muitos estudos tem sido realizados com o objetivo de buscar produtos originários de plantas, com componentes químicos eficazes no controle da placa bacteriana associadas à atividade antiinflamatória e cicatrizante, deixando de ser apenas um recurso terapêutico viável ao poder aquisitivo, passando a existir como prática oficial da medicina e a ser reconhecida e utilizada pelos órgãos de saúde pública e deste modo adquirir a confiabilidade da população.

Com esses objetivos, no presente trabalho desenvolveu-se um dentifício na forma gel com extratos fluidos de *Calendula officinalis* L. (Asteraceae) e *Casearia sylvestris* Sw (Flacourtiaceae), que apresentam propriedades terapêuticas como antiinflamatório, anti-séptico e cicatrizante, avaliando-se as várias alternativas disponíveis em matérias-primas e excipientes, que atendessem aos requisitos farmacotécnicos, restrições legislativas e condições compatíveis com a associação dos extratos destas plantas e, posteriormente, verificar a capacidade inibitória *in vitro*, frente a microorganismos usualmente encontrados em processos periodonto-patogênicos placa dependente e placa independente: *Streptococcus mutans*, *Candida albicans* e *Staphylococcus aureus*.

MATERIAL E MÉTODOS

• Material botânico

Inflorescências de *Calendula officinalis* foram adquiridas no comércio, secas e estabilizadas e, posteriormente, processadas em moinho de facas, até obtenção de pó fino, segundo Farmacopéia Brasileira IV (1988).

Folhas de *Casearia sylvestris* foram coletadas no município de Piraquara, Paraná, Brasil. A identificação botânica foi realizada por Gert Hatschbach (Museu Botânico da Prefeitura Municipal de Curitiba, Paraná, Brasil). Um exemplar encontra-se depositado no Herbário do Setor de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Paraná, sob o número UPCB 31.362. Após a coleta foram secas e estabilizadas em estufa com circulação de ar (40°C), sendo posteriormente trituradas em moinho de facas, até obtenção de pó fino segundo Farmacopéia Brasileira IV (1988).

• Elaboração dos extratos fluidos

Os extratos fluidos foram preparados com o material acima obtido, de acordo com a técnica descrita na Farmacopéia Brasileira II (1959), processo A, (maceração seguida da percolação), empregando como líquido extrator o etanol 40°G.L, para ambos os extratos. A ajustagem do concentrado foi efetuado em evaporador rotatório à vácuo, para obtenção da relação 1:1 dos extra-

tos fluidos, conforme determina a Farmacopéia Brasileira IV (2002), estabelecendo-se os flavonóides como marcador químico.

• Determinação do teor de flavonóides nos extratos fluidos

Para a determinação do teor de flavonóides, empregou-se a metodologia da Farmacopéia Helvética VII (1992,1995) na monografia de *Calendula officinalis* e da *Passiflora incarnata* com modificações para a *Casearia sylvestris*.

• Formulação dentifírcia

O dentifício foi elaborado conforme técnica farmacêutica apropriada com os seguintes componentes: água destilada, ácido etilenodiaminotetracético dissódico, carboximetilcelulose sódica, corante azul FD&C, decil poliglicose, dióxido de silício coloidal pirogênica e precipitada, glicerina, laurilsulfato de sódio, sacarina sódica, sorbitol e polietilenoglicol 6000.

Neste veículo incorporou-se os extratos fluidos de *Calendula officinalis* e *Casearia sylvestris* estabelecendo-se as designações:

Dentifício CO – 10% de extrato fluido de *Calendula officinalis*

Dentifício CS – 10% de extrato fluido de *Casearia sylvestris*

Dentifício CC – 10% de extrato fluido de *Calendula officinalis* e 10% de extrato fluido de *Casearia sylvestris*

Dentifício DC – controle – ausência de extratos fluidos

Dentifício DT – controle positivo (2,4,4-tricloro-2'-hidroxi-fenil-éter: *triclosan*)

• Avaliação da atividade antimicrobiana in vitro

Os testes de atividade antimicrobiana *in vitro* foram realizados nos dentifícios CO, CS, CC e DC

As cepas selecionadas para a realização dos testes foram: *Candida albicans* (ATCC 10231), *Staphylococcus aureus* (ATCC 8538) e *Streptococcus mutans* (ATCC 25175).

Para estes ensaios empregou-se a metodologia para a avaliação da atividade inibitória de preparações nas formas líquidas, semi-sólidas e sólidas (método da placa de ágar, variação para sólidos), segundo procedimentos da FIOCRUZ/INCQS (1992).

Os meios de cultura empregados foram: para a atividade bacteriostática o ágar nutriente e caldo nutriente e para a atividade fungistática o ágar neopeptona glicosado 2% e caldo neopeptona 2%.

Como controle positivo da capacidade de difusão da preparação, realizou-se a avaliação de uma formulação dentifírcia DT, com um agente bacteriostático de atividade inibitória reconhecida (*triclosan*), frente a *Escherichia coli*, de acordo com os procedimentos anteriores.

RESULTADOS

Os resultados dos ensaios estão listados nas **Tabelas I, II e III**.

DISCUSSÃO

Os dentifrícios na forma de géis e pastas dentais são as mais adequadas para a aplicação de um agente terapêutico na cavidade oral, pois, além de serem preparações de baixo custo, fundamentais à higiene pessoal e capaz de veicular princípios ativos com eficácia, abrangem as necessidades dos portadores de gengivites e periodontias, Nunes (1996).

Atualmente, poucos produtos estão disponíveis no mercado empregando as propriedades terapêuticas dos extratos vegetais, a maioria utiliza apenas agentes químicos geralmente associados a agentes físicos. Com o avanço tecnológico ocorrido nas últimas décadas, muitos benefícios foram agregados aos dentifrícios, porém, o interesse do consumidor é o comprovado benefício terapêutico em relação ao custo do produto. O desafio dos pesquisadores é apresentar novas alternativas usando agentes terapêuticos eficazes em condições que satisfaçam ao consumidor, tanto do ponto de vista farmacológico, como organoléptico.

A busca para atender a estes requisitos resultou na identificação de particularidades na *Calendula officinalis*, como a aplicação no tratamento de periodontias, Garcia *et al.* (1998), atividade anti-séptica do óleo essencial, Garcia (2000), atividade inibitória sobre bactérias da placa bacteriana, Buffon *et al.* (2001); atividade antimicrobiana sobre o *Staphylococcus aureus*, PDR (2000). As propriedades da *Casearia sylvestris* como cicatrizante, para tratamento de lesões na cavidade oral, Scavone *et al.* (1979), lesões herpéticas (herpes simples), Camargo *et al.* (1993), Sato (1998), atividade antimicrobiana, Barbosa *et al.* (1998), frente ao *Staphylo-*

TABELA I
Determinação do teor de flavonóides nos extratos fluidos de *Calendula officinalis* e *Casearia sylvestris*

Amostras (n=3)	Teor de flavonóides (%)
Extrato fluido de <i>Calendula officinalis</i>	0,278% ± 0,016
Extrato fluido de <i>Casearia sylvestris</i>	0,132% ± 0,002

TABELA II
Teste de atividade antimicrobiana dos dentifrícios CO, CS, CC e DC

Microorganismos testados	Dentifrício CO	Dentifrício CS	Dentifrício CC	Dentifrício DC
<i>Cândida albicans</i>	-	+	+	-
<i>Staphylococcus aureus</i>	+	+	+	-
<i>Streptococcus mutans</i>	+	-	+	-

CO - 10% de extrato fluido de *Calendula officinalis*

CS - 10% de extrato fluido de *Casearia sylvestris*

CC - 10% de extrato fluido de *Calendula officinalis* e 10% de extrato fluido de *Casearia sylvestris*

DC - dentifrício controle

(+) - formação de halo de inibição (segundo FIO/CRUZ/INCQS)

(-) - halo de inibição ausente (segundo FIO/CRUZ/INCQS)

TABELA III
Teste de atividade antimicrobiana do dentifrício DT - controle positivo (2,4,4-tricloro-2'-hidroxi-fenil-éter: triclosan) frente à *Escherichia coli*

Microorganismo testado	Dentifrício DT
<i>Escherichia coli</i>	+

(+) - ocorrência de difusão do dentifrício no ágar.

coccus epidermidis e do óleo essencial frente ao *Bacillus subtilis*, Souza *et al.* (1997) e para tratamento de gengivites, Spring (1997), despertou o interesse para aplicação em afecções orais. Com a associação destas plantas, buscou-se o sinergismo das atividades antimicrobiana, antiinflamatória e cicatrizante.

A determinação do teor de flavonóides nos extratos fluidos auxiliou na averiguação da qualidade e monitoramento do processo extrativo, fatores essenciais a obtenção de produtos eficazes (Tabela I). Estes resultados condizem com os teores obtidos nas drogas vegetais *Calendula officinalis* e *Casearia sylvestris*, de 0,27% e 0,13%, respectivamente, Arantes (2002).

Segundo Koo (1999) e Park *et al.* (1998), o controle do crescimento do *Streptococcus mutans* ocasiona uma significativa redução na deposição da placa bacteriana nos dentes.

A manifestação clínica da periodontia placa independente está relacionada de forma muito freqüente ao desenvolvimento dos microorganismos *Candida albicans* e *Staphylococcus aureus*. Lesões provocadas por *Candida albicans* (candidíase, estomatite cremosa) são causadas pelo desequilíbrio da microbiota normal e o desenvolvimento deste microorganismo oportunista, Trabulsi *et al.* (1999), Neves (2000).

O *Staphylococcus aureus* manifesta-se oportunamente e de forma freqüente invadindo tecidos lesionados, provocando o agravamento de quadros traumáticos, podendo levar ao desenvolvimento de abscessos e manifestações sistêmicas, Trabulsi *et al.* (1999), Jorge (1995).

Para análise dos resultados dos testes de atividade antimicrobiana (Tabela II) empregou-se a metodologia descrita pelo Manual de Saneantes da Fiocruz/INCQS (1992) para preparações líquidas, semi-sólidas e sólidas, sendo a atividade comprovada por meio da formação de um halo de inibição. Deste modo, nestes ensaios os resultados mostraram que os dentifrícios CO (10% de extrato fluido de *Calendula officinalis*) e CC (10% de extrato fluido de *Casearia sylvestris* associada a 10% de extrato fluido de *Calendula officinalis*) apresentaram resultados positivos, com formação de halo de inibição frente ao *Streptococcus mutans* e dos dentifrícios CO (10% de extrato fluido de *Calendula officinalis*), CS (10% de extrato fluido de *Casearia sylvestris*) e CC (10% de extrato fluido de *Casearia sylvestris* associada a 10% de extrato fluido de *Calendula officinalis*) frente ao *Staphylococcus aureus* e dos dentifrícios CS (10% de extrato fluido de *Casearia sylvestris*) e CC (10% de extrato fluido de *Casearia sylvestris* associada a 10% de extrato fluido de *Calendula officinalis*) para a *Candida albicans*.

Paralelamente, submeteu-se o dentifrício controle DC ao teste de atividade antimicrobiana (Tabela II). O produto apresentou a formação de um pequeno halo de inibição, quase imperceptível, mas presente, supondo que esta ação seja decorrente do uso de conservantes, umectantes e surfactantes sobre alguns microorganismos gram positivos, Rebello (2001), Cavalcanti *et al.* (1986).

Como controle positivo da capacidade de difusão da preparação, realizou-se a avaliação de uma formulação dentifrícia (DT) com um agente bacteriostático de

atividade inibitória reconhecida, triclosan, frente a *Escherichia coli* de acordo com os mesmos procedimentos aplicados às amostras destinadas a avaliação inibitória dos extratos fluidos. Verificou-se que esta se difundiu adequadamente e apresentou o halo de inibição (Tabela III).

Na continuidade para confirmação da eficácia da atividade antimicrobiana do produto, propõe-se a realização de testes para a determinação da concentração inibitória mínima, regressão linear e ensaios toxicológicos, destas formulações para aplicação efetiva e segura.

CONCLUSÃO

O aparecimento do halo de inibição ao redor da preparação CC (10% de extrato fluido de *Casearia sylvestris* associada a 10% de extrato fluido de *Calendula officinalis*), indica atividade inibitória bacteriostática e fungistática, mostrando as propriedades terapêuticas da associação dos extratos fluidos contra microorganismos presentes em placa bacteriana e patologias bucais.

REFERÊNCIAS

- Arantes, B. J. Desenvolvimento de dentifícios com extratos fluidos de *Calendula officinalis* L. (Asteraceae) e *Casearia sylvestris* Sw. (Flacourtiaceae), destinado ao tratamento de periodontias, Paraná: UFPR, 1991. 91p. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) – Setor de Ciências da Saúde, Universidade Federal do Paraná.
- Barbosa, A. D.; Ferreira, R. C. V.; Valente, P. H. Atividade antimicrobiana de extratos fluidos de plantas medicinais brasileiras. *Lecta-USF*, 12(2): 153-163, 1994.
- Buffon, M. C. M. et al. Avaliação da eficácia dos extratos de *Malva sylvestris*, *Calendula officinalis*, *Plantago major*, *Curcuma zedoaria* no controle do crescimento das bactérias da placa dentária. Estudo *in vitro*. *Visão Acadêmica*, 2:1-12, 2001.
- Burnet, G. W.; Scherp, B. S.; Schuster, G. S. Microbiologia oral e doenças infecciosas. 4.ed. São Paulo: Guanabara Koogan, 1991. p.214-222.
- Camargo, F. G. et al. uso do extrato fluido de guaçatonga (*C. sylvestris*) topicamente em lesões de estomatite herpética. *Lecta-USF*, 11 (1): 121-127, 1993.
- Cavalcanti, A. J.; Miranda, V. C.; Rocca, R. A. Ação antimicrobiana de pastas dentifricas contendo ou não fluoretos. *Rev Odont Rio Grande do Sul*, 34(5): 366-70, 1986.
- Farmacopéia Brasileira. 4.ed. Parte I. São Paulo: Atheneu, 1988.
- Farmacopéia dos Estados Unidos do Brasil. 2.ed. São Paulo: Siqueira, 1959. p.449.
- Farmacopéia Brasileira. 4.ed. Parte II. São Paulo: Atheneu, 2002.
- Garcia, B. B. et al. Gengivite de origem inflamatória e terapêutica homeopática. *Pesq Homeopática*, 13(2): 56-77, 1998.
- Garcia, A. A. Fitoterapia vademecum de prescription. 3.ed. Barcelona: Masson Press, 2000. p.127-128.
- Jorge, A. O. C. Microbiologia bucal. São Paulo: Santos, 1995. p.1-92.
- Koo, H. Avaliação do potencial anti-cárie e antiplaca de propólis de *Apis mellifera* selecionadas de duas regiões do Brasil. Piracicaba: FOP 1999. 117p. Tese (Doutorado em Odontologia) – Faculdade de Odontologia de Piracicaba, 1999.
- Manual de Saneantes. Fundação Instituto Oswaldo Cruz/Instituto Nacional de Controle de Qualidade e Saneantes. Rio de Janeiro, 1992.
- Neves, M. I. R. Candidíase oral x AIDS. Medcenter, 2000. Disponível <http://www.odontologia.com.br/artigos.asp?id=100&ler-s>acesso em: 17 dez. 2000>.
- Newbrun, E. Cariologia. 2.ed. São Paulo: Santos, 1990. p.17-154.
- Nunes, J. Desenvolvimento de dentifícios específicos para diferentes faixas etárias. São Paulo: USP 1996. 155p. Tese (Doutorado em Farmaco e Medicamentos) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, 1996.
- Park, Y. K. et al. Effects of propolis on *S. mutans*, *Actinomyces naeslundii* and *Staphylococcus aureus*. *Rev Microbiol*, 29(2): 143-148, 1998.
- PDR for herbal medicines 2000. 2.ed. New Jersey: Medical Economics Company, 2000. p.497-499.
- Pharmacopoea Helvetica VII. 7ª ed. Bern: Department Federal de L'Interieur, 1992, 1995.
- Rebello, T. F. S. Tensoativos com ação antimicrobiana. *Cosmet. Toiletries*, 13: 38, 2001.
- Sato, M. E. O. Estudo da estabilidade de uma formulação na forma gel, veiculando extrato fluido de *C. sylvestris*. São Paulo: USP, 1998. 180p. Tese (Doutorado em Farmaco e Medicamentos) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, 1998.
- Saxer, U.; Jaschouz, V.; Ley, F. The effect of periodontal gingival bleeding. *J Clin Dent*, 52: 63-64, 1994.
- Saxer, U. et al. The effect of two toothpaste on plaque and gingival inflammation. *J Clin Dent*, 6(2): 154-6, 1995.
- Scavone, A. C. et al. Guaçatonga (*C. sylvestris*): aspectos botânicos da planta, ensaios fitoquímicos e propriedade cicatrizante da folha. *An Farm Quim*, 19(1): 73-81, 1979.
- Souza, G. H. B. et al. Atividade antimicrobiana de óleos essenciais extraídos de plantas utilizadas na medicina popular brasileira. In: Jornada Paulista de Plantas Medicinais. 3., 1997, Araraquara: Universidade Estadual de São Paulo, Anais... Araraquara, 1997. p.92-93.
- Spring, C. O uso da *Casearia sylvestris* no tratamento da gengivite crônica, na cidade de Joinville-SC. Itajaí: Univali, 1997, 32p. Monografia (Especialização em Farmácia de Manipulação) – Curso de Especialização em Farmácia de Manipulação – Universidade Vale do Itajaí, 1997.
- Trabulsi, L. R. et al. Microbiologia. 3ª ed. São Paulo: Atheneu, 1999. p.413-415.

Endereço para correspondência

Mayumi Eliza Otsuka Sato, Laboratório de Tecnologia Farmacêutica, Universidade Federal do Paraná – e-mail: mayumi@ufpr.br
Av. Prefeito Lothário Meissner, 3400 – Jardim Botânico
CEP: 80.210-170 – Curitiba – Paraná