



**UNIVERSIDADE VILA VELHA**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS**

**DISSERTAÇÃO DE MESTRADO**

**ATIVIDADE ANTIBACTERIANA DE COLUTÓRIOS DE *Mikania glomerata*  
Sprengel E *Mikania laevigata* Schultz Bip. ex Baker NA DESINFECÇÃO DE  
ESCOVAS DENTAIS**

**CLAUDIA HELENA BERMUDES GRILLO**

**VILA VELHA**  
**MARÇO, 2012**



**UNIVERSIDADE VILA VELHA**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS**

**ATIVIDADE ANTIBACTERIANA DE COLUTÓRIOS DE *Mikania glomerata*  
Sprengel E *Mikania laevigata* Schultz Bip. ex Baker NA DESINFECÇÃO DE  
ESCOVAS DENTAIS**

Dissertação apresentada à Universidade Vila Velha, como pré-requisito do Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas, para a obtenção do título de Mestre em Ciências Farmacêuticas.

Orientadora: Profa. Dra. Fernanda Campos Rosetti Lessa  
Co-orientadora: Profa. Dra. Denise Coutinho Endringer

**CLAUDIA HELENA BERMUDES GRILLO**

**VILA VELHA**  
**MARÇO, 2012**

**Catlogação na publicação elaborada pela Biblioteca  
Central / UVV-ES**

**G859a Grillo, Claudia Helena Bermudes.**

Atividade antibacteriana de colutórios de *Mikania glomerata Sprengel* e *Mikania laevigata* Schultz Bip. ex Baker na desinfecção de escovas dentais / Claudia Helena Bermudes Grillo. – 2012.

**68 f. : il.**

**Orientadora: Fernanda Campos Rosetti Lessa.**

**Co-orientadora: Denise Coutinho Endringer.**

**Dissertação de Mestrado**

**ATIVIDADE ANTIBACTERIANA DE COLUTÓRIOS DE *Mikania glomerata*  
Sprengel E *Mikania laevigata* Schultz Bip. ex Baker NA DESINFECÇÃO DE  
ESCOVAS DENTAIS**

**CLAUDIA HELENA BERMUDES GRILLO**

Aprovada em 26 de março de 2012,

Banca Examinadora:



---

Prof. Dr. Paulo Nelson Filho

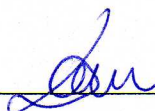
Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto - USP



---

Profa. Dra. Elizabeth Pimentel Rosetti

Universidade Vila Velha - UVV



---

Profa. Dra. Denise Coutinho Endringer

Universidade Vila Velha – UVV

(Co-orientadora)



---

Profa. Dra. Fernanda Campos Rosetti Lessa

Universidade Vila Velha – UVV

(Orientadora)

Este trabalho foi realizado no Laboratório de Obtenção de Produtos Naturais, no Laboratório de Microbiologia da Universidade Vila Velha e no Departamento de Agricultura da Universidade Federal de Lavras com financiamento da Fundação de Amparo à Pesquisa do Espírito Santo (FAPES, Processo nº 45422648/09) e com concessão de bolsa de estudos da UVV.

Dedico este trabalho...

Aos meus pais, Edith (*in memoriam*) e Milton (*in memoriam*)

Ao meu marido, Eduardo

Às minhas filhas, Marina e Vitória

## AGRADECIMENTOS

A Deus,

“Que nos deu o Dom da vida, nos presenteou com a liberdade, nos abençoou com a inteligência e nos deu a graça de lutarmos para a conquista de nossas realizações”. Obrigada por estar sempre presente, iluminando o meu caminho e me dando a força que preciso nos momentos difíceis e desafiadores.

Aos meus pais, Edith (*in memoriam*) e Milton (*in memoriam*)

Por todo esforço que sempre dispensaram em prol de minha educação, acreditando ser essa a maior herança que podemos deixar para os nossos filhos. Em especial ao meu pai que no momento mais difícil de sua vida não pude estar inteira ao seu lado...

Ao meu marido, Eduardo

Pelo amor, companheirismo, dedicação, amizade, paciência, estímulo, cumplicidade... São incontáveis as suas qualidades. Pai e mãe nos momentos da minha ausência. A você, meu amor, meu “porto seguro”, todo agradecimento é pouco, e as palavras insuficientes para expressar meu sentimento. Saiba que essa conquista não é só minha, mas nossa.

Às minhas filhas, Marina e Vitória

Por compreenderem minha ausência necessária. Pelo sorriso de vocês, pelo doce olhar, pelo apoio de crianças que mais pareciam adultos compartilhando comigo de todas as dificuldades, me fazendo acreditar que tudo é possível quando realmente temos um objetivo. Por estarem ao meu lado em todos os momentos. Minhas filhas, razão do meu viver e incentivo para superar as dificuldades e atingir meus ideais.

Aos meus irmãos, cunhadas e sobrinhos

Pelo incentivo, apoio e compreensão em todos os momentos.

À minha orientadora e co-orientadora, Fernanda e Denise

Que além de orientarem, me acolheram, compreendendo todos os meus momentos, mostrando o caminho a seguir e os meios seguros para atingir os objetivos propostos. Minha gratidão e admiração, além da certeza da solidificação de uma grande amizade.

Aos docentes do Mestrado em Ciências Farmacêuticas/UVV

Pela atenção, orientação e ensinamentos que recebi ao longo do curso.

Às colegas Mírian e Fernanda Endringer

Pelo empenho, dedicação, apoio e companheirismo fundamentais para a realização da parte clínica desse trabalho.

Aos Laboratórios de Microbiologia e de Farmácia pela contribuição no processamento microbiológico e produção das soluções necessárias a esse trabalho.

À Escola São Domingos

Pelo apoio e confiança na realização clínica desse trabalho.



Aos colegas de mestrado

Pela amizade, convivência e experiências compartilhadas no decorrer do curso, tornando essa jornada agradável e produtiva.

À amiga Margareth

Pela atenção, companheirismo, motivação, colaboração direta e decisiva nesse trabalho.

Aos amigos

Pela compreensão de minha ausência nos momentos de alegria e curtição.

**“Aprendi com as Primaveras a me deixar cortar para poder voltar sempre inteira.”**

**Cecília Meireles**

## RESUMO

**Objetivo:** Realizar ensaio microbiológico *in vitro* de extratos etanólicos e soluções de guaco (*M. glomerata* e *M. laevigata*) contra *Streptococcus mutans*; avaliar clinicamente a eficácia de soluções de guaco na desinfecção de escovas dentais utilizadas por pré-escolares; realizar a contagem de colônias/biofilmes após 30 dias do uso das escovas. **Métodos:** Diluíram-se os extratos e soluções numa faixa de concentração de 2,4-500,0 µg/mL para cálculo da CIM por meio do ensaio colorimétrico do MTT. Para a avaliação *in vivo*, após determinação da concentração da solução a ser utilizada, distribuíram-se aleatoriamente 24 crianças, positivas para estreptococos do grupo mutans, em quatro grupos (quatro fases intercaladas por uma semana). Após a escovação sem creme dental de 1 minuto, realizada por um único profissional, as escovas foram pulverizadas com água e soluções de *M. glomerata*, de *M. laevigata* e de clorexidina a 0,12%. A análise microbiológica foi realizada após 4 horas. Após 30 dias do uso das escovas realizou-se a contagem de colônias/biofilmes. Dados do tratamento *in vitro* e *in vivo*, expressados como valores médios ± erro padrão da média, foram submetidos à ANOVA e análise de variância Kruskal-Wallis, respectivamente. Foi determinada a significância estatística para ação antibacteriana pelo teste t de Student e para a desinfecção das escovas pelo teste de Dunn. Diferenças foram significativas quando  $p < 0,05$ . **Resultados:** A CIM dos extratos foi de 400 µg/mL. A concentração da solução usada foi a 2,5%. Observou-se contaminação por estreptococos do grupo mutans após uma única escovação em todas as escovas de dente. Todas as soluções diminuíram a contaminação das escovas por estreptococos do grupo mutans (clorexidina  $50,7 \pm 17,7\%$ ; *M. glomerata*  $37,3 \pm 23,7\%$  e *M. laevigata*  $28,7 \pm 25,1\%$  de inibição). O tratamento com clorexidina e *M. glomerata* foram semelhantes. Não houve diferença entre os tratamentos com o guaco (*M. glomerata* e *M. laevigata*). O tratamento com solução de *M. laevigata* diferiu do tratamento com clorexidina. **Conclusão:** Baseado nos resultados do presente estudo pôde-se concluir que, a *M. glomerata* e a *M. laevigata* diminuíram a contaminação das escovas de dente por estreptococos do grupo mutans, sendo que a *M. glomerata* apresentou a mesma eficácia da clorexidina.

**Palavras-chave:** *Mikania*, Escova dental, Estreptococos do grupo mutans, Antibacterianos, Guaco

## ABSTRACT

### **In-vivo evaluation of Guaco mouthwashes on the disinfection of toothbrushes**

**Aims:** To perform the microbiological assay in vitro of ethanol extracts and solutions guaco (*M. glomerata* and *M. laevigata*) against mutans streptococci, to evaluate clinically the effectiveness of solutions guaco to disinfect toothbrushes used by preschool, to count the colonies/biofilms after 30 days of the use of brushes.

**Methods:** Extracts were diluted and solutions in a concentration range of 2.4 – 500 µg/mL for calculating the MIC by means of the MTT colorimetric assay. After determining the concentration of the solution to be used in vivo study, were randomly distributed in 24 patients, for mutans streptococci in four groups (four stages interspersed with one week). After brushing without toothpaste 1 minute, held by a single training, the toothbrushes were sprayed with water and solutions of *M. glomerata*, *M. laevigata* and chlorhexidine 0.12%. Microbiological analysis was performed after 4 hours. After 30 days of using brushes made to count colonies/biofilms. Data treatment in vitro and in vivo, expressed as mean ± standard deviation, were submitted to ANOVA analysis of variance and Kruskal-Wallis test, respectively. We determined the statistical significance for antibacterial activity by Student's t test and for the disinfection of brushes by Dunn's test. Differences were significant at  $p < 0.05$ .

**Results:** The MIC of the extracts was 400 µg/mL. The solution concentration used was 2.5%. Contamination was observed mutans streptococci after a single brushing in all toothbrushes. All solutions decreased contamination of toothbrushes by mutans streptococci ( $50.7 \pm 17.7\%$  chlorhexidine,  $37.3 \pm 23.7\%$  *M. glomerata* and *M. laevigata*  $28.7\% \pm 25.1\%$  inhibition). The treatment with chlorhexidine and *M. glomerata* were similar. There was no difference between treatments with guaco (*M. glomerata* and *M. laevigata*). The treatment solution of *M. laevigata* differed from treatment with chlorhexidine.

**Conclusion:** Based on the results of this study it was concluded that *M. glomerata* and *M. laevigata* decreased contamination of toothbrushes by mutans streptococci, and the *M. glomerata* had the same efficacy of chlorhexidine.

**Keywords:** Mikania, Toothbrush, mutans Streptococci, Antibacterial, Guaco

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ANOVA	Análise de Variância <i>One Way</i>
ATCC	American Type Culture Collection
CaSa B	Caldo Sacarose-Bacitracina
CBM	Concentração Bactericida Mínima
CEP	Comitê de Ética em Pesquisa
CIM	Concentração Inibitória Mínima
CLAE	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
DAG/UFLA	Departamento de Agricultura da Universidade Federal de Lavras
ECC	Cárie Precoce da Infância
EMG	Extrato Etanólico de <i>Mikania glomerata</i>
EML	Extrato Etanólico de <i>Mikania laevigata</i>
GC-MS	Cromatografia Gasosa Acoplada a Massas
HPLC	High Performance Liquid Chromatography
MEV	Microscópio Eletrônico de Varredura
MTT	Brometo de 3-(4,5-dimetil-tioazol-2-ila)-2,5-difenil-tetrazólio
RDC	Resolução da Diretoria Colegiada
SB <sub>20</sub>	Meio de Cultura Sacarose Bacitracina 20%
ufc	Unidades Formadoras de Colônia
UFRGS	Universidade Federal do Rio Grande do Sul

## SUMÁRIO

RESUMO

ABSTRACT

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

1 INTRODUÇÃO .....	13
1.1 REVISÃO DE LITERATURA .....	14
1.1.1 Desinfecção de escovas dentais .....	14
1.1.2 Emprego de produtos naturais na desinfecção de escovas dentais	19
1.1.3 <i>Mikania laevigata</i> Schultz Bip. ex Baker e <i>Mikania glomerata</i> Sprengel .....	20
2 OBJETIVOS .....	24
2.1 OBJETIVO GERAL .....	24
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	24
3 ENCARTE DE PUBLICAÇÃO .....	25
4 CONCLUSÃO .....	53
5 REFERÊNCIAS .....	54

APÊNDICES

ANEXOS

## 1 INTRODUÇÃO

A cárie dentária é uma doença infecciosa, multifatorial, caracterizada por um processo dinâmico decorrente da interação entre biofilme dental, carboidratos e saliva, formando ácidos orgânicos que levam à desmineralização das estruturas dentárias pela perda de íons de hidroxiapatita, tendo como principal agente etiológico os estreptococos do grupo mutans, seguidos pelos *Lactobacillus*, *Actinomyces* e outros gêneros (KRASSE et al. 1988; Van HOUTE et al., 1994; BEZERRA; TOLEDO, 1999; DITMYER et al., 2011; PARK et al., 2011; PAULA et al., 2012).

A odontologia moderna cada vez mais enfatiza o controle das doenças que acometem a cavidade bucal e a atenção na aplicação de medidas preventivas. A remoção mecânica do biofilme dentário, pela escovação, coadjuvada pelo uso do fio/fita dental, representa o meio mais eficaz, acessível e difundido para manutenção da saúde bucal (CHIAPINOTTO et al., 2001), sendo, a escovação dental considerada o método primário de higiene bucal (SPOLIDORIO et al., 2003).

Existem evidências de que as escovas dentais, após serem utilizadas, podem ser contaminadas por diferentes tipos de bactérias, vírus, leveduras e parasitas intestinais (BUNETEL et al., 2000; LONG et al., 2000; SILVEIRA et al., 2002; QUIRYNEN et al., 2003; KENNEDY et al., 2003; PAULA et al., 2012; DITMYER et al., 2011; PARK et al., 2011), podendo servir como fonte para inoculação/reinoculação de microrganismos com potencial patogênico, como os estreptococos do grupo mutans (TAJI; ROGERS, 1998).

Para evitar que a escova se torne um reservatório de microrganismos, o ideal é que seja armazenada em local adequado e que passe por desinfecção frequente. Assim, pesquisas adicionais são necessárias na busca de meios práticos, eficazes e, sobretudo, de baixo custo, para o controle da contaminação das escovas dentais particularmente por (*S. mutans*), com a finalidade de evitar a infecção cruzada, impedir a re-inoculação de microrganismos e diminuir a contaminação de superfícies não contaminadas (DEVINE et al. 2007).

Vários agentes químicos têm sido descritos na literatura para sua desinfecção (LARA et al. 2001; SANCHES et al. 2001; QUIRYNEN et al. 2001; CHIBEBE JÚNIOR 2002; NELSON-FILHO et al. 2006; NEAL; RIPPIN 2003; QUIRYNEN et al., 2003; DEVINE et al., 2007). Entre eles, pode-se citar o peróxido de hidrogênio, os óleos essenciais, o cloreto de cetilperidínio, os dentifrícios contendo triclosan, a clorexidina a 0,12%, solução alcoólica a 77% e até o hipoclorito de sódio a 1%. O gluconato de clorexidina a 0,12% apresentou maior eficácia, sendo este o agente antimicrobiano de escolha para desinfecção de escovas (ARAÚJO BRITTO et al., 2009; SOUZA et al, 2009).

Plantas medicinais e fitoterápicos têm sido empregados como alternativas de tratamento para afecções odontológicas descritas em diversos estudos (ALMEIDA et al., 1998; BUFFON et al., 2001; PEREIRA, 2004; PEREIRA et al., 2006; OLIVEIRA et al., 2007; NGUEYEM et al., 2008).

As espécies *Mikania laevigata* Schultz Bip. ex Baker e *Mikania glomerata* Sprengel, são lianas nativas da Mata Atlântica, pertencentes à família Asteraceae, tribo Eupatorieae e sub-tribo Mikaninae (NEVES; SÁ, 1991; RITTER et al., 1992). São popularmente conhecidas como guaco e empregadas na medicina tradicional como anti-séptico, contra febre, sífilis, eczema, coceira na pele e como cicatrizante, broncodilatador, analgésico e anti-inflamatório (DAVINO et al., 1989; BOTSARIS, 1997; CRIDDLE et al., 1996; MATOS, 1998).

## 1.1 REVISÃO DE LITERATURA

### 1.1.1 Desinfecção de escovas dentais

O primeiro relato que tratava sobre a contaminação bacteriana e desinfecção de escovas data de 1920 (COBB, 1920). No trabalho, todos os microrganismos comumente encontrados na cavidade bucal foram descritos e posteriormente encontrados também nas cerdas das escovas dentais (COBB, 1920). O emprego de



escovas contaminadas, portanto, poderia provocar a reinoculação destes microrganismos na cavidade bucal numa próxima escovação (COBB, 1920; ANKOLA et al., 2009). Assim, o esfregaço contínuo de microrganismos sobre os tecidos bucais pode desencadear sérios efeitos, como infecções recorrentes. O emprego de soluções antissépticas, como o etanol, foi desde então sugerido para minimizar a ocorrência de infecções recorrentes na cavidade bucal (COBB, 1920).

Além do etanol, o emprego de solução de nitrato de prata ou em água fervente para imersão durante 15 minutos, antes e após a utilização das escovas também foi sugerido como alternativa de desinfecção de escovas dentais (KAUFFMANN, 1924). O emprego de água para enxague das escovas foi verificado por Lehmer e Appleton (1931). Neste estudo, foi evidenciado presença de 100 unidades formadoras de colônia (ufc) de bactérias nas escovas dentais apenas enxaguadas em água de torneira (LEHMER; APPLETON, 1931).

Outros cuidados como armazenamento em local seco e limpo ou acondicionamento em recipiente fechado, com ventilação, permitindo a secagem das cerdas, uso individualizado das escovas e descarte frequente também são indicados (KAUFFMANN, 1924). Após a escovação dentária rotineira, comumente ocorrem bacteremias transitórias, fato importante em indivíduos com comprometimento do sistema imunológico, indivíduos submetidos a transplantes de órgãos e portadores de cardiopatias (GRIMOUD et al., 2011; RWENYONYI et al., 2011; SALES-PERES et al. 2012; PAULA et al., 2012). No Brasil, ainda temos o agravante do uso comunitário de uma mesma escova, principalmente nos indivíduos de baixo nível socioeconômico, contribuindo para o aumento da transmissão de microrganismos (SVANBERG, 1978; NEWBRUN, 1992; PINTO et al., 1997).

Embora o enxague da escova ajude a reduzir o grau de contaminação das cerdas, microrganismos patogênicos residuais ainda permanecem ativos. Para minimizar a contaminação das escovas e conseqüentemente a reinfecção, o processo de desinfecção deve ser iniciado logo após sua primeira utilização e manter uma rotina diária de aplicação de antissépticos para prevenir a formação do biofilme bacteriano sobre as mesmas até a sua troca (NEAL; RIPPIN, 2003).

Eventualmente, pode haver contato direto entre escovas de diferentes membros da família, nos recipientes sobre a pia ou nos armários de banheiro (FRATTO et al., 1990). Em ambientes como creches, pré-escolas e outras instituições com crianças de tenra idade é dificultoso o controle de contato salivar entre indivíduos, podendo a escova ser trocada e/ou compartilhada, inadvertidamente (MALMBERG et al., 1994; KUMARIHAMY et al., 2011)

Várias pesquisas foram realizadas avaliando inúmeras substâncias e equipamentos quanto sua eficácia de desinfecção de escovas dentais, as quais, sob condições usuais de armazenamento, podem servir como um veículo de inoculação/reinoculação de microrganismos oportunistas ou patogênicos na cavidade bucal, sempre na busca de um método fácil, econômico e seguro para desinfecção das mesmas e manutenção da saúde bucal e geral (WHITLEY; GILMORE, 1973; FEO, 1981; NELSON; GLASS, 1989; FRATTO et al., 1990; GLASS JENSEN, 1994; CAUDRY et al., 1995; GLASS et al., 1996; MEIER et al., 1996; GLASS et al., 1997; ZOLNOWSKI-CASEY, 1998; LARA et al., 2001; SANCHES et al., 2001; QUIRYNEN et al., 2001; CHIBEBE JÚNIOR, 2002; NELSON-FILHO et al. 2006; NEAL; RIPPIN, 2003; QUIRYNEN et al., 2003; SATO et al., 2004).

Nelson-Filho *et al.* (2000) determinaram o nível de contaminação de escovas dentais de crianças por estreptococos do grupo mutans, verificando a eficácia de três substâncias na desinfecção, gluconato de clorexidina a 0,12%, hipoclorito de sódio a 1,0% e água de torneira esterilizada. Após escovação supervisionada, as escovas foram submetidas ao processamento microbiológico empregando-se meio de cultura seletivo para *S. mutans*, Caldo Sacarose-Bacitracina (CaSa B). As escovas foram avaliadas quanto ao número de colônias/biofilmes de estreptococos do grupo mutans, em microscópio estereoscópico e luz refletida, com confirmação pela semeadura em SB<sub>20</sub>. As cerdas de duas escovas de cada grupo foram submetidas a análise em microscópio eletrônico de varredura (MEV). Os resultados demonstraram que não ocorreu crescimento bacteriano nas escovas tratadas com gluconato de clorexidina a 0,12% e hipoclorito de sódio a 1,0% (NELSON-FILHO et al., 2000). Por outro lado, nas escovas tratadas somente com água observou-se o desenvolvimento de *S. mutans* em todas as escovas, com números variando de 21 a 120 ufc.

Posteriormente, o mesmo grupo de pesquisadores avaliou a eficácia de dentifrícios contendo ou não triclosan (por 4 minutos) e sem dentifrícios, na desinfecção de escovas empregadas por escolares de 5 a 7 anos de idade (NELSON-FILHO et al., 2004). No grupo que não usou dentifrício, os estreptococos do grupo mutans foram encontrados em 93,3% das escovas, variando de 11 a +100 ufc, sendo incontável em 12 escovas. Na escovação realizada com dentifrício fluoretado, 76,7% das escovas apresentavam-se colonizadas por *S. mutans*, com número de ufc variando de 5 a +100, sendo o mesmo incontável em 11 escovas. Somente 40,0% das escovas dentais do grupo que realizou a escovação utilizando dentifrício contendo triclosan, encontravam-se contaminadas por *S. mutans*, com variação de 2 a +100 ufc, sendo esse número incontável somente em 2 escovas. De acordo com a análise estatística, a eficácia do dentifrício contendo triclosan foi significativamente maior, podendo este ser indicado com o objetivo de reduzir a contaminação das cerdas de escovas dentais de crianças, por estreptococos do grupo mutans (NELSON-FILHO et al., 2004).

Mais recentemente, o mesmo grupo comparou o uso de spray de solução de clorexidina a 0,12%, irradiação por microondas durante sete minutos e água de torneira esterilizada na desinfecção de chupetas e escovas de dente contaminadas por *S. mutans* e mostraram que a clorexidina e o microondas foram eficazes na supressão das colônias/biofilmes, sendo estatisticamente semelhantes entre si ( $p > 0,05$ ), diferindo da água esterilizada, que foi considerada de baixa eficiência (NELSON-FILHO et al., 2011).

Em estudo semelhante, a eficácia de quatro soluções, água de torneira esterilizada (controle), solução experimental placebo, solução experimental contendo Cosmocil CQ<sup>â</sup>, e o Brushtox<sup>®</sup> na desinfecção de escovas dentais utilizadas por 40 crianças de 5 a 12 anos de idade foi avaliada por (NELSON-FILHO et al. 2006). Exceto a água, as demais soluções experimentais, inclusive o placebo, a solução experimental contendo Cosmocil CQ<sup>â</sup> e o Brushtox<sup>®</sup> foram eficazes na inibição da formação do biofilme nas cerdas das escovas, sendo o Brushtox<sup>®</sup> a solução antimicrobiana que demonstrou melhores resultados na inibição no desenvolvimento de microrganismos sobre as cerdas das escovas dentais (NELSON-FILHO et al. 2006).

A eficácia de soluções placebo, clorexidina, cloreto de cetilpiridínio a 0,05% e água de torneira esterilizada foram avaliadas sob a forma de spray, na desinfecção de escovas dentais de adultos (SATO et al., 2004). O estudo foi realizado em 30 voluntários, cada indivíduo recebeu quatro escovas novas e utilizou as quatro soluções experimentais, uma por semana, aplicando seis borrifos nas cerdas, após cada escovação. Ao final de cada semana, as escovas foram recolhidas e submetidas à análise microbiológica. As bactérias anaeróbias foram recuperadas em 83,3% das amostras, estreptococos em 80% e bacilos gram-negativos em 46,7% das amostras nos testes controle. Houve uma significativa redução da contaminação das escovas dentais com a utilização de soluções antimicrobianas, sob a forma de spray, contendo clorexidina ou cloreto de cetilpiridínio, sendo que a primeira promoveu maior redução das contagens de bactérias (SATO et al., 2004).

No estudo de Barbosa (2003) foi avaliada a contaminação microbiana de escovas dentais, bem como eficácia do ciclo de escovação com dentífrico fluoretado, seguido da aplicação de soluções experimentais para a desinfecção das escovas dentais de pacientes portadores de necessidades especiais (solução de gluconato de clorexidina a 0,12%, de cloreto de cetilpiridínio e de água de torneira) (BARBOSA, 2003). As escovas foram submetidas ao processamento microbiológico em meio de cultura seletivo para estreptococos do grupo mutans. Foi observado que nas escovas onde se utilizou a água de torneira, estavam presentes em 76,9% das cerdas colônias de estreptococos do grupo mutans, com número ufc variando de 0 a +100. Nas escovas onde foi utilizada a clorexidina a 0,12%, não foi observada colonização por estreptococos do grupo mutans. Nas escovas onde foi utilizado o cloreto de cetilpiridínio, apenas 10,2% das escovas estavam contaminadas, com números de ufc variando de 1 a 31 (BARBOSA, 2003). Dessa forma, evidencia-se que mesmo com todos os cuidados externos, a contaminação das escovas ocorre e a desinfecção torna-se de fato um importante instrumento para diminuir a reinfecção.

A clorexidina é o antisséptico mais utilizado no controle do biofilme dental, considerado como padrão ouro. É solúvel em água e em pH fisiológico dissocia-se liberando seu componente catiônico que interage rapidamente com cargas negativas da parede celular bacteriana, levando a uma alteração no equilíbrio osmótico bacteriano e apoptose. Além disso, apresenta a propriedade de substantividade (capacidade de ser liberada gradativamente) sendo detectada na saliva até 24 horas

após sua administração (ARAÚJO BRITTO et al., 2009; SOUZA et al, 2009). Seu uso é limitado devido seus efeitos colaterais: manchamento dos dentes, perda do paladar, sensação de boca ardente, descamações da mucosa e reações alérgicas ocasionais (ARAÚJO BRITTO et al., 2009).

### **1.1.2 Emprego de produtos naturais na desinfecção de escovas dentais**

Historicamente, espécies vegetais constituem uma fonte efetiva para a descoberta e o desenvolvimento de fármacos e produtos de prevenção empregados na terapia moderna (WHO, 2002; BUTLER, 2005). Um total de mais de 122 produtos naturais derivados de plantas têm sido utilizados como fármacos (FABRICANT; FARNSWORTH, 2001; NEWMAN; CRAGG, 2007).

No Brasil, o uso de espécies vegetais com fins medicinais é uma prática difundida, enriquecida pelas diferenças culturais, provenientes dos índios, negros e europeus (BRANDÃO, 2003). Soma-se a esses, a vasta biodiversidade brasileira, abrangendo cerca de 20% da biodiversidade mundial (IPEMA, 2005), principalmente devido à rica biodiversidade encontrada na Mata Atlântica.

No entanto, ainda é incipiente a produção de fármacos e fitoterápicos nacionais desenvolvidos a partir de produtos naturais ou espécies vegetais de origem brasileira (BRANDÃO, 2010). Apenas cerca de 20% do total estimado de espécies ocorrentes no país, foram farmacologicamente avaliadas (YOUNES et al., 2007). Com a devastação dos biomas brasileiros, especialmente da Mata Atlântica, esse número será ainda mais reduzido nos próximos anos.

No Brasil, a Resolução da Diretoria Colegiada (RDC) n° 14 de março de 2010 preconiza que todo medicamento preparado exclusivamente a partir de matéria-prima vegetal seja classificado com fitoterápico e deve ter segurança e eficácia comprovadas (BRASIL, 2010). Matéria-prima vegetal é definida como a planta medicinal, a droga vegetal ou o derivado vegetal, sendo planta medicinal a espécie vegetal, cultivada ou não, utilizada com propósitos terapêuticos; e droga vegetal é aquela que passa por processos de estabilização e secagem da planta medicinal,

em cujo processo pode ser empregado apenas as partes da planta medicinal ricas nas substâncias, ou classes dessas substâncias, responsáveis pela ação terapêutica (BRASIL, 2010).

Plantas medicinais e fitoterápicos vem sendo usados como alternativas de tratamento para afecções odontológicas descritas em diversos estudos (PEREIRA, 2004; PEREIRA et al., 2006; BUFFON et al., 2001; OLIVEIRA et al., 2007; ALMEIDA et al., 1998; NGUEYEM et al., 2008). Espécies como romã (*Punica granatum L.*), sálvia (*Salvia officinalis L.*), calêndula (*Calendula officinalis L.*), *Bridelia grandis* Pierre ex Hutch (*Euphorbiaceae*), bacupari (*Rheedia brasiliensis* Planch. & Triana) apresentaram atividade antimicrobiana contra o micropatógenos orais, especialmente estreptococos do grupo mutans (ALMEIDA et al., 1998; BUFFON et al., 2001; NGUEYEM et al., 2008). No entanto, não existem estudos que relatam a eficácia de soluções de produtos naturais na desinfecção de escovas.

### **1.1.3 *Mikania laevigata* Schultz Bip. ex Baker e *Mikania glomerata* Sprengel**

As espécies conhecidas como guaco (*Mikania laevigata* Schultz Bip. ex Baker e *Mikania glomerata* Sprengel) apresentam várias indicações populares. A atividade antimicrobiana dessas espécies pode estar relacionada aos usos populares como antisséptico, contra febre, sífilis, eczema, coceira na pele e como cicatrizante (DAVINO et al., 1989; BOTSARIS, 1997; CRIDDLE et al., 1996; MATOS, 1998; MEDEIROS; KANIS, 2010).

As espécies *M. laevigata* e *M. glomerata* são lianas nativas da Mata Atlântica, pertencentes à família Asteraceae, tribo Eupatorieae e sub-tribo Mikaninae (NEVES; SÁ, 1991; RITTER et al., 1992). São empregadas uma em substituição à outra em função da similaridade anatomo-morfológica e da ocorrência em locais análogos (GASPERETTO et al., 2010). O uso indistinto dessas espécies também ocorre devido às suas propriedades organolépticas, pois ambas podem apresentar variações na forma das folhas e odor característico de cumarina (REHDER et al., 2000, LIMA et al., 2003).

Bertolucci *et al.* (2009) evidenciaram que há marcantes diferenças qualitativas e quantitativas entre as amostras analisadas de *M. laevigata* e *M. glomerata*. O extrato etanólico de *M. laevigata* levou ao isolamento de cumarina, dos diterpenos ácidos benzoilgrandiflórico, cinamoilgrandiflórico e caurenóico e de uma mistura de stigmasterol e  $\beta$ -sitosterol. No entanto, do extrato etanólico de *M. glomerata* foi isolado apenas o ácido caurenóico.

O guaco (*M. glomerata*) integra a lista de registro simplificado de fitoterápicos, sendo indicado como broncodilatador e expectorante de uso oral (BRASIL, 2004). O uso dessa espécie como agente antimicrobiano não está preconizado nessa resolução, devendo-se realizar ensaios que comprovem a eficácia do produto.

A atividade do guaco contra microrganismos ocorrentes na microbiota bucal (*Candida albicans*, *Streptococcus mutans*, *Streptococcus sobrinus*) foi avaliada em vários estudos (SANTOS; TOMASSINI; CABRAL, 1998; DUARTE *et al.*, 2005; YATSUDA *et al.*, 2005). O óleo essencial de *M. laevigata* apresentou concentração inibitória mínima (CIM) de 0,25 mg/mL contra *Candida albicans* (ATCC 10231), *in vitro*, e os extrato alcoólico e óleo essencial de *M. glomerata* não apresentaram atividade antimicótica contra esse microrganismo (DUARTE *et al.*, 2005; YATSUDA *et al.*, 2005). A atividade de extratos e frações de *M. glomerata* e *M. laevigata* contra o principal microrganismo envolvido no desenvolvimento da cárie dental, *S. mutans*, também foi avaliada (YATSUDA *et al.*, 2005). As amostras foram analisadas por cromatografia gasosa acoplada a massas (GC-MS). A análise cromatográfica da fração hexânica metilada de *M. laevigata* indicou ser a cumarina o componente principal desse extrato (40,08%) (YATSUDA *et al.*, 2005). A CIM e concentração bactericida mínima (CBM) desta fração foram de 12,5 a 100  $\mu$ g/mL (YATSUDA *et al.*, 2005). Para a fração hexânica metilada de *M. glomerata* observou-se que substância majoritária, cerca de 50%, era ácido caurenóico. Esta fração apresentou CIM entre 12,5 a 25  $\mu$ g/mL e CBM foi de 25 a 400  $\mu$ g/mL (SANTOS *et al.*, 1998; YATSUDA *et al.*, 2005). Os extratos etanólicos de ambas *Mikania* apresentaram a mesma atividade bactericida, apresentando CIM e CBM, respectivamente de 25 e 50  $\mu$ g/mL (YATSUDA *et al.*, 2005).

Destaca-se o efeito do solvente extrator (água, etanol e éter) sobre a atividade dos extratos de folhas de *M. laevigata*. Diferentes solventes empregados e os extratos

resultantes foram analisados quanto à atividade antimicrobiana, antioxidante, e citotoxicidade e ao teor de cumarina (OKUYAMA et al., 2011). O extrato etanólico apresentou a maior concentração de cumarina e o melhor efeito contra *E. coli*, mas também foi o mais citotóxico. O extrato etéreo foi menos citotóxico, porém foi menos ativo contra bactérias, e apresentou baixa concentração cumarina e reduzida atividade antioxidante. O extrato aquoso não apresentou citotoxicidade em concentrações abaixo de 20 mg/mL e apresentou a maior atividade antioxidante, com atividade antibacteriana e teor de cumarina similar aos do extrato etanólico, confirmando o uso popular do extrato aquoso de *M. laevigata* (OKUYAMA et al., 2011).

A segurança farmacológica de preparações fitoterápicas de *M. glomerata* e *M. laevigata* foram avaliadas em vários estudos de toxicidade *in vivo*. O efeito do extrato hidroalcoólico de partes aéreas de *M. glomerata* foi avaliado sobre o sistema reprodutor de ratos durante noventa dias, com dose diária de 3,3 g/Kg de peso corporal (SÁ et al., 2010). Nenhuma alteração significativa foi observada sobre o sistema reprodutor, indicando que, na dose utilizada, o extrato hidroalcoólico de *M. glomerata* não apresentou efeito tóxico e nem interferiu com a fertilidade de ratos Wistar submetidos a um tratamento de longa duração (SÁ et al., 2010). O mesmo estudo realizado durante 52 dias, também não alterou a produção de gametas, níveis de testosterona sérica e ingestão de alimentos (SÁ et al., 2003).

A análise da toxicidade aguda em ratos Wistar machos de extratos fluidos de *M. glomerata* e *M. laevigata*, em dose única por via oral de 5 a 10 mL/kg, não evidenciou a morte em nenhum dos animais (OLIVEIRA et al., 1985). Na dose de 40 mL/kg, ambos os extratos produziram efeito letal em 40% dos animais, no período de observação, indicando baixa toxicidade desses extratos (OLIVEIRA et al., 1985).

A genotoxicidade mutagenicidade do macerado e do infuso de *M. glomerata* foram avaliadas empregando-se ensaios de micronúcleo e cometa *in vitro* (COSTA et al., 2008). A alteração no DNA das linhagens celulares foi observada na concentração de 10 a 20 µL/mL, indicando certa genotoxicidade *in vitro* (COSTA et al., 2008). Entretanto, em ensaio *in vivo* em ratos Wistar, na dose de 3,3 g/Kg de peso corporal de extrato etanólico de *M. glomerata* não foram observados efeitos genotóxicos nos



animais tratados e nenhuma morte ou prejuízo à fixação e desenvolvimento dos embriões (SÁ et al., 2006).

A avaliação da segurança farmacológica de xarope de guaco foi realizada empregando administração oral e intraperitoneal em ratos Wistar de ambos os sexos (GRAÇA et al., 2007a). A  $DL_{50}$  calculada para a administração intraperitoneal foi de 0,904 g/kg, para ratos de ambos os sexos, e de 0,967 e 0,548 g/kg, respectivamente para ratos machos e fêmeas. A  $DL_{50}$  para a dose oral foi calculada foi cerca de 10 vezes maior que a intraperitoneal, 10g/kg de peso corporal. Nenhum efeito tóxico na fertilidade de ratos Wistar foi observado em animais tratados, por gavagem, diariamente com xarope de *M. laevigata* (com concentrações de 3, 5; 7,0 e 14,0 mg/kg de cumarina) durante 90 dias (GRAÇA et al., 2007b).

Pelo exposto, selecionou-se o extrato aquoso de ambas as espécies para ser empregado como agente ativo das soluções para desinfecção de escovas, em função da atividade antimicrobiana e segurança farmacológica.

## 2 OBJETIVOS

### 2.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar a atividade antibacteriana de soluções de *Mikania laevigata* Schultz Bip. ex Baker e *Mikania glomerata* Sprengel em crianças em idade pré-escolar utilizada na desinfecção de escovas dentais, por meio de estudo clínico, duplo cego aleatório.

### 2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Realizar ensaio microbiológico *in vitro* dos extratos etanólicos e das soluções de *M. glomerata* e *M. laevigata*.
- Avaliar a atividade antimicrobiana das soluções de *M. glomerata* e *M. laevigata* em comparação à clorexidina na desinfecção de escovas dentais.
- Realizar a contagem de colônias/biofilmes após 30 dias do uso das escovas dentais.

## 3 ENCARTE DE PUBLICAÇÃO

**Atividade antibacteriana de soluções de *Mikania glomerata* Sprengel e *Mikania laevigata* Schultz Bip. ex Baker na desinfecção de escovas dentais**

Claudia H.B. Grillo<sup>1</sup>, Fernanda E. Pinto<sup>1</sup>, Bethânia. B. Lorençon<sup>2</sup>, João Damasceno Lopes Martins<sup>1</sup>, Suzan K.V. Bertolucci<sup>3</sup>, José Eduardo B.P. Pinto<sup>3</sup>, Fernanda C.R. Lessa<sup>1\*</sup>, Denise C. Endringer<sup>1,2\*</sup>

<sup>1</sup> Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas, Universidade Vila Velha, Vila Velha, Espírito Santo;

<sup>2</sup> Campus Vila Velha, Instituto Federal do Espírito Santo, Vila Velha, Espírito Santo;

<sup>3</sup> Departamento de Agricultura, Universidade Federal de Lavras, Lavras, Minas Gerais.

Running title: Uso da *Mikania* (guaco) em Odontologia

Denise C. Endringer, Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas, Universidade Vila Velha, Rua Comissário José Dantas de Melo, nº21, Boa Vista, CEP 29102-770, Vila Velha, Espírito Santo

Telefax: 55-27- 3421-2001

E-mail: [endringe@gmail.com](mailto:endringe@gmail.com); [denise.endringer@ifes.edu.br](mailto:denise.endringer@ifes.edu.br)

Grillo CHB, Pinto F.E, Lorençon BL, Martins JDL, Bertolucci SKV, Pinto JEBP, Lessa FCR, Endringer DC. Atividade antibacteriana de soluções de *Mikania glomerata* Sprengel e *Mikania laevigata* Schultz Bip. ex Baker na desinfecção de escovas dentais. Eur J Oral Sci

## RESUMO

*Mikania glomerata* e *Mikania laevigata* (guaco) possuem ação antimicrobiana e podem auxiliar na diminuição da incidência de doenças bucais. Objetivou-se preparar extratos etanólicos e soluções de guaco, analisar por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) os extratos e soluções, realizar ensaio microbiológico *in vitro* de extratos etanólicos e soluções de guaco contra *Streptococcus mutans*; avaliar clinicamente a eficácia de soluções de guaco na desinfecção de escovas dentais utilizadas por pré-escolares; realizar a contagem de colônias/biofilmes após 30 dias do uso das escovas. Diluíram-se os extratos e soluções numa faixa de concentração de 500 µg/mL a 2,4 µg/mL para cálculo da CIM por meio do ensaio colorimétrico do MTT. Após determinação da concentração da solução a ser utilizada no estudo *in vivo*, distribuíram-se aleatoriamente 24 crianças, positivas para *S. mutans*, em quatro grupos (quatro fases intercaladas por uma semana). Após a escovação sem creme dental de 1 min. realizada por um único profissional, as escovas foram pulverizadas com água e soluções de *M. glomerata*, de *M. laevigata* e de clorexidina a 0,12%. A análise microbiológica foi realizada após 4 horas. Após 30 dias do uso das escovas realizou-se a contagem de colônias/biofilmes. Dados do tratamento *in vitro* e *in vivo*, expressados como valores médios  $\pm$  erro padrão da média, foram submetidos à ANOVA e análise de variância Kruskal-Wallis, respectivamente. Foi determinada a significância estatística para ação antibacteriana pelo teste t de Student e para a desinfecção das escovas pelo teste de Dunn. Diferenças foram significativas quando  $p < 0,05$ . A CIM dos extratos foi de 400 µg/mL. A concentração da solução usada foi a 2,5%. Observou-se contaminação por estreptococos do grupo mutans após uma única escovação em todas as escovas de dente. Todas as soluções diminuíram a contaminação das escovas por estreptococos do grupo mutans (clorexidina  $50,7 \pm 17,7\%$ ; *M. glomerata*  $37,3 \pm 23,7\%$  e *M. laevigata*  $28,7 \pm 25,1\%$  de inibição). O tratamento com clorexidina e *M.*

*glomerata* foram semelhantes. Não houve diferença entre os tratamentos com o guaco (*M. glomerata* e *M. laevigata*). O tratamento com solução de *M. laevigata* diferiu do tratamento com clorexidina. O marcador químico cumarina não foi detectado na solução de *M. glomerata* e em *M. laevigata* foi de 0,04% mg/mg. Conclui-se que, a *M. glomerata* e a *M. laevigata* diminuíram a contaminação das escovas de dente por estreptococos do grupo mutans, sendo que a *M. glomerata* apresentou a mesma eficácia da clorexidina e que a cumarina não está envolvida na ação antibacteriana.

**Palavras-chave:** *Mikania*, Escova dental, Estreptococos do grupo mutans, Antibacterianos, Guaco

Denise C. Endringer, Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas, Universidade Vila Velha, Rua Comissário José Dantas de Melo, nº21, Boa Vista, CEP 29102-770, Vila Velha, Espírito Santo. Telefax: 55-27- 3421-2001

E-mail: [endringe@gmail.com](mailto:endringe@gmail.com); [denise.endringer@ifes.edu.br](mailto:denise.endringer@ifes.edu.br)

## Introdução

Cárie precoce da infância (ECC) é uma condição largamente observada no mundo podendo desencadear a perda dos elementos da dentição decídua além de abscessos, dor e má oclusão quando não tratadas (1,2,3). A elevada prevalência de ECC em crianças está relacionada ao cuidado dos pais, aos hábitos alimentares, à educação sobre saúde bucal na família e na escola (1,2,3).

ECC é uma doença infecciosa, multifatorial e complexa (3). Trata-se de um processo dinâmico decorrente da interação prolongada entre biofilme dental, carboidratos, saliva e microrganismos cariogênicos (2,3). Os estreptococos do grupo mutans estão fortemente associados à ECC(4).

A remoção mecânica do biofilme dentário, pela escovação, coadjuvada pelo uso do fio/fita dental, representa o meio mais eficaz, acessível e difundido para manutenção da saúde bucal, sendo, a escovação dental considerada o método primário de higiene bucal (5). Diversos métodos de escovação são amplamente descritos, porém, pouco se discute sobre a desinfecção de escovas.

Existem evidências de que as escovas dentais, após serem utilizadas, podem ser contaminadas por diferentes tipos de bactérias, vírus, leveduras e parasitas intestinais (3,6-10), podendo servir como fonte para inoculação/reinoculação de microrganismos com potencial patogênico, como o *S. mutans* (11,12). Adicionalmente, pode ocorrer o contato direto entre escovas de diferentes membros da família, nos recipientes sobre a pia ou nos armários de banheiro (13). Em ambientes como creches, pré-escolas e outras instituições com crianças de tenra idade é dificultoso o controle de contato salivar entre indivíduos, podendo a escova ser trocada e/ou compartilhada, inadvertidamente (2,14)

Para evitar que a escova se torne um reservatório de microrganismos, o ideal é que ela seja armazenada em local adequado e que passe por desinfecção frequente (15). Assim, pesquisas são necessárias na busca de meios práticos, eficazes e, sobretudo, de baixo custo, para o controle da contaminação das escovas dentais particularmente por estreptococos do grupo mutans, com a finalidade de evitar a infecção cruzada, impedir a re-inoculação de microrganismos e diminuir a contaminação de superfícies não contaminadas (15).

Vários agentes químicos têm sido descritos na literatura para sua desinfecção (7,15-19). Entre eles, podem ser citados o peróxido de hidrogênio, os óleos essenciais, o cloreto de cetilperidínio, os dentifrícios contendo triclosan, clorexidina a 0,12%, solução alcoólica a 77% e até o hipoclorito de sódio a 1%. O gluconato de clorexidina a 0,12% apresentou maior eficácia, sendo este o agente antimicrobiano de escolha para desinfecção de escovas. (17-19).

Plantas medicinais e fitoterápicos são usados como alternativas de tratamento para afecções odontológicas descritas em diversos estudos (21-24). Espécies como romã (*Punica granatum* L.), sálvia (*Salvia officinalis* L.), calêndula (*Calendula officinalis* L.), *Bridelia grandis* Pierre ex Hutch (*Euphorbiaceae*), bacupari (*Rheedia brasiliensis* Planch. & Triana) apresentaram atividade antimicrobiana contra micropatógenos orais, especialmente estreptococos do grupo mutans (24). No entanto, não existem estudos que relatam a eficácia de soluções de produtos naturais na desinfecção de escovas.

As espécies conhecidas como guaco (*Mikania laevigata* Schultz Bip. ex Baker e *Mikania glomerata* Sprengel) apresentam várias indicações populares, tais como antisséptico, contra febre, sífilis, eczema, coceira na pele e como cicatrizante (25-28). São empregadas uma em substituição a outra em função da similaridade anatomo-morfológicas e da ocorrência em locais análogos (29).

Bertolucci *et al.* (29) evidenciaram que há marcantes diferenças qualitativas e quantitativas entre as amostras analisadas de *M. laevigata* e de *M. glomerata*. Os derivados do ácido cinâmico, ácido *o*-cumárico e cumarina foram detectados apenas em *M. laevigata*, estando ausentes na *M. glomerata*. Já os diterpenos ácidos benzoilgrandiflórico, cinamoilgrandiflórico e caurenóico foram quantificados em ambas as espécies. Porém, os ácidos benzoilgrandiflórico e cinamoilgrandiflórico apresentaram maiores teores na *M. laevigata*, enquanto o ácido caurenóico é mais abundante na *M. glomerata* (0,74%) (29).

A atividade do guaco contra microrganismos ocorrentes na microbiota bucal (*Candida albicans*, *S. mutans* e *Streptococcus sobrinus*) foi avaliada em vários estudos (30-32). O óleo essencial de *M. laevigata* apresentou concentração inibitória mínima (CIM) de 0,25 mg/mL contra *C. albicans* (ATCC 10231), *in vitro*, e o extrato

alcoólico e óleo essencial de *M. glomerata* não apresentaram atividade antimicrobiana contra esse microrganismo (31,32). A atividade de extratos e frações de *M. glomerata* e *M. laevigata* contra o principal microrganismo envolvido no desenvolvimento da cárie, *S. mutans*, também foi avaliada (32). As amostras foram analisadas por cromatografia gasosa acoplada a massas (GC-MS). A análise cromatográfica da fração hexânica metilada de *M. laevigata* indicou ser a cumarina o componente principal desse extrato (40,08%) (32). A CIM e concentração bactericida mínima (CBM) desta fração foram de 12,5 a 100 µg/mL e possivelmente o agente responsável pela atividade antimicrobiana (32). Para a fração hexânica metilada de *M. glomerata* observou-se que substância majoritária, cerca de 50%, era ácido caurenóico e possivelmente este seria o componente químico responsável pela atividade. Esta fração apresentou CIM entre 12,5 a 25 µg/mL e CBM foi de 25 a 400 µg/mL (30,32). Os extratos etanólicos de ambas as *Mikánias* apresentaram a mesma atividade bactericida, apresentando CIM e CBM, respectivamente de 25 e 50 µg/mL, não sendo possível então estabelecer um único constituinte químico responsável pela atividade antimicrobiana observada (32).

A segurança farmacológica de preparações fitoterápicas de *M. glomerata* e *M. laevigata* foram avaliadas em vários estudos de toxicidade *in vivo*. O efeito do extrato hidroalcoólico de partes aéreas de *M. glomerata* foi avaliado sobre o sistema reprodutor de ratos durante noventa dias, com dose diária de 3,3 g/Kg de peso corporal (33). Nenhuma alteração significativa foi observada sobre o sistema reprodutor, indicando que, na dose utilizada, o extrato hidroalcoólico de *M. glomerata* não apresentou efeito tóxico e nem interferiu com a fertilidade de ratos Wistar submetidos a um tratamento de longa duração (33). O mesmo estudo realizado durante 52 dias, também não alterou a produção de gametas, níveis de testosterona sérica e ingestão de alimentos (34).

A genotoxicidade mutagenicidade do macerado e do infuso de *M. glomerata* em etanol 80% foram avaliadas empregando-se ensaios de micronúcleo e cometa *in vitro* (35). A alteração no DNA das linhagens celulares foi observada na concentração de 10 a 20 µL/mL, indicando genotoxicidade *in vitro* (35). Entretanto, em ensaio *in vivo* em ratos Wistar, na dose de 3,3 g/Kg de peso corporal de extrato etanólico de *M. glomerata* não foram observados efeitos genotóxicos nos animais



tratados e nenhuma morte ou prejuízo à fixação e desenvolvimento dos embriões (36).

Pelo exposto, selecionou-se o extrato aquoso de folhas de ambas as espécies para ser empregado como agente ativo das soluções para desinfecção de escovas, em função da atividade antimicrobiana e segurança farmacológica. Este estudo objetivou preparar extratos etanólico e soluções de guaco, seguida da análise por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) dos mesmos e a eficácia *in vitro* e *in vivo* de soluções preparadas com extratos de *M. glomerata* e *M. laevigata* na desinfecção de escovas dentais empregadas por crianças de dois a cinco anos de idade.

## **Material e Métodos**

### *Material vegetal*

O material vegetal foi cultivado sob condições controladas de temperatura, umidade e luminosidade no campo experimental do Setor de Plantas Medicinais do Departamento de Agricultura da Universidade Federal de Lavras (DAG/UFLA), situada nas coordenadas geográficas 21° 14' S e 45° 00 W, a 918 m de altitude (37). A identificação botânica das espécies vegetais objetos desse estudo foi realizada pela botânica Dra. Mara Ritter da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS). Exsiccatas de *Mikania glomerata* Sprengel e *Mikania laevigata* Schultz Bip. ex Baker foram depositadas no herbário do Instituto de Biociências da UFRGS, sob o registro ICN 141992 e ICN 141990.

O material vegetal foi submetido à secagem em estufa de ventilação, a 40 °C, seguido de moagem em moinhos de facas. A umidade residual, o teor de cinzas totais e o teor de extraíveis por etanol do material vegetal seco foi determinado de acordo com o descrito pela OMS (38).

O material vegetal seco de *M. glomerata* (260 g) e de *M. laevigata* (100 g) foi submetido à percolação com EtOH 96° GL. O extrato e tanólico foi concentrado em evaporador rotatório, a 50 °C, sob pressão reduzida, até resíduo, respectivamente, 55 g extrato etanólico de *M. glomerata* (EMG) e 35 g de extrato etanólico de *M. laevigata* (EML).

### *Preparação das soluções de M. glomerata e de M. laevigata*

Para a preparação das soluções de cada espécie seguiu-se a formulação das soluções comerciais, com modificações. Resumidamente, pesaram-se exatamente 2,5 g do extrato etanólico de cada espécie e ressuspenderam-se em 20 mL de etanol (Dinâmica, Diadema, São Paulo, Brasil). Ao sobrenadante foram adicionados 1 mL de polissorbato 20 (Vetec-Sigma-Aldrich, Duque de Caxias, Rio de Janeiro, Brasil), 200 mg de sacarina (Vetec-Sigma-Aldrich, Duque de Caxias, Rio de Janeiro, Brasil), 10 mL de glicerina (Dinâmica, Diadema, São Paulo, Brasil), e água ultrapura (18  $\Omega$ , Purificador Elga) qsp 100 mL. As soluções foram armazenadas a 4°C, até o momento de uso.

### *Análise por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) dos extratos e soluções*

A análise por CLAE foi conduzida em um módulo de separação Waters 1515, equipado com bomba binária, e detector UV/VIS (modelo 2489), sendo os dados processados pelo software Breeze. Foi utilizada coluna de fase reversa XBridge C18 (150 x 4.6 mm i.d., 3.5  $\mu$ m, Waters), em conjunto com a pré-coluna XBridge C-18 (20 x 4.6 mm i.d., 3.5  $\mu$ m, Waters), e fluxo de 0,5 mL/min. A análise foi realizada à temperatura ambiente, com detecção nos comprimentos de onda de 274 nm. Foi utilizada eluição isocrática MeOH:água, 47:53 (39). O solvente usado foi de grau HPLC (Merck, Darmstadt, Alemanha), a água era ultrapura (ELGA, 18.2  $\Omega$ ) e foi degaseificada por sonicação antes do uso. Tanta solução de referência cumarina (Sigma, St. Louis, Mo, USA) quanto as amostras (EMG, EML e soluções) foram solubilizadas em MeOH, grau HPLC (Merck, Darmstadt, Alemanha). A concentração das amostras foi de 1 mg/mL. A concentração final das soluções de referência empregadas na construção da curva padrão 0,03 a 0,6  $\mu$ g/mL. As amostras e soluções de referência foram centrifugadas a 8.400g por 5 min. Foram injetados 20  $\mu$ L das amostras e soluções padrão, manualmente no aparelho. As análises foram realizadas em triplicata.

*Avaliação da atividade antimicrobiana in vitro contra S. mutans dos extratos e soluções de M. glomerata e M. laevigata*

A análise da atividade antimicrobiana foi realizada de acordo com o descrito por Spolidorio et al. (40) e Taji & Rogers (11). Empregou-se a cepa padrão *Streptococcus mutans* ATCC 25175™. Previamente ao ensaio, o cultivo bacteriano foi ativado por meio do subcultivo em BHI-ágar (Merck, Darmstadt, Alemanha) durante 24 horas a 37°C. Após a ativação padronizou-se o inóculo em  $10^8$  ufc.mL<sup>-1</sup>, que constituiu na preparação de uma suspensão do microrganismo em solução salina estéril, com turvação similar ao tubo 0,5 da escala MacFarland, preparado com 0,05 mL de cloreto de bário a 1% (Dinâmica, Diadema, São Paulo, Brasil) e 9,95 mL de ácido sulfúrico a 1% (Merck, Darmstadt, Alemanha). A suspensão foi ainda confirmada por análise comparativa em leitor de ELISA (TP-Reader, Thermoplate, 620 nm) tendo como padrão a leitura obtida na solução referente ao tubo 0,5 da escala de MacFarland.

Realizou-se a diluição seriada dos extratos e soluções, com faixa de concentração de 500 µg /mL a 2,4 µg/mL, a fim de se calcular a CIM. Em cada poço, foram adicionados 100 µL do Caldo Sacarose Bacitracina (Casa B), 100 µL do inóculo e 50 µL da solução teste. Empregou-se clorexidina 0,12 % (Periogard® - Colgate Palmolive – Kolynos do Brasil Ltda.) como controle positivo e solução de dimetilsulfóxido a 10% (Sigma, St. Louis, Mo, USA) como controle negativo. Foram também avaliados a solução branco da solução (sem a adição de extratos) em presença do inóculo. O controle microbiológico das soluções também foi realizado incubando-se apenas as soluções teste em CaSa B. As placas foram seladas e incubadas a 37°C por 48 horas. Após a incubação foram adicionados 10 µL de solução de brometo de 3-(4,5-dimetil-tioazol-2-ila)-2,5-difenil-tetrazólio (MTT, 5 mg/mL) (Sigma, St. Louis, Mo, USA), e posteriormente incubada pelo período adicional de 3 h. Ao final, as soluções do tratamento experimental e controle, foram adicionados 100 µL de uma solução de isopropanol acidificado em HCl a 40 µM (Merck, Darmstadt, Alemanha). A leitura foi realizada em leitor de microplacas (TP-Reader, Thermoplate) no comprimento de onda de 595 nm. O ensaio foi realizado em triplicata, sendo duas colunas para cada diluição testada, e a CIM foi definida

como a menor concentração das amostras testadas que inibiu visivelmente o crescimento do microrganismo testado.

*Ensaio clínico do uso de soluções de M. glomerata e M. laevigata na desinfecção de escovas dentais*

Após a aprovação do projeto pelo Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) envolvendo seres humanos da Universidade Vila Velha (CEP-UVV nº 193-2009), foi obtido o consentimento livre e esclarecido dos pais ou responsáveis por cada indivíduo participante da pesquisa. Foram pré-selecionadas para participar deste estudo 50 crianças, alunos de escola particular localizada no município de Vitória, de ambos os gêneros, sem distinção de etnia, na faixa etária de 2 a 5 anos de idade, que apresentaram dentição decídua completa e boa saúde geral. Além desses critérios de inclusão, as crianças deveriam apresentar estreptococos do grupo mutans na saliva e como critério de exclusão não deveriam ter usado antibiótico nos últimos 3 meses.

A determinação da presença de estreptococos do grupo mutans nas crianças foi realizada empregando-se o Kit Dentocult® SM Strip mutans (Orion Diagnostica Oy, Espoo, Finlândia), específico para confirmação da identidade desse microrganismo na saliva. É um método baseado na aderência e crescimento de estreptococos do grupo mutans em tiras plásticas, em meio de cultura seletivo. O kit contém tubos com meio seletivo, discos de bacitracina e tiras plásticas. Amostras de saliva foram coletadas nas tiras diretamente na cavidade bucal das crianças. As tiras foram fixadas na tampa do tubo e submersas no meio de cultura com bacitracina. Os tubos foram identificados e incubados a 37 °C por 48 horas com abertura da tampa de ¼ de volta. Após a incubação o crescimento dos estreptococos do grupo mutans foi identificado pela contagem de colônias/biofilmes presentes na tira. Após a análise das tiras, foram selecionadas somente as crianças que apresentaram estreptococos do grupo mutans, totalizando 38 crianças.

As crianças foram divididas por sorteio (aleatorização), utilizando tabela de números aleatórios, em quatro grupos que seguiram o protocolo “cross-over” aleatório, duplo-cego. O estudo constou de quatro etapas, em semanas intercaladas, de forma que as 4 soluções (água, clorexidina a 0,12 % - Periogard® - Colgate

Palmolive – Kolynos do Brasil Ltda., solução de EMG a 2,5% e solução de EML a 2,5%) foram utilizadas em todas as etapas, sob a forma de rodízio, por grupos de crianças diferentes, com o intuito de minimizar a interferência de fatores de confusão nos resultados. Participaram das quatro etapas da pesquisa 24 crianças, devido ausência no ambiente escolar nos dias da pesquisa, totalizando 96 escovas dentais avaliadas.

Em cada etapa, as crianças receberam escovas dentais Sanifil Leader® infantil (Facilit Odontológica e Perfumaria Ltda.), com cerdas macias e cabeça pequena, devidamente codificadas. Foram então, submetidas à escovação dental, realizada por um único profissional, sem dentifrício, na posição de Starkey (41), seguindo sempre a mesma sequência. O tempo de escovação empregado foi de um minuto, padronizado com auxílio de cronômetro digital.

Após a escovação, as escovas foram cuidadosamente enxaguadas, em água de torneira, e o excesso de água removido das cerdas, batendo-se levemente o cabo da escova contra a borda da pia. A seguir, as escovas foram suspensas em posição vertical pelo profissional, com a cabeça voltada para cima e, a uma distância de no máximo 5 cm entre a cabeça da escova e o frasco. Cada solução foi borrifada, sob a forma de spray, sobre as cerdas por cinco vezes, num total de aproximadamente 0,5 mL por escova dental.

As escovas foram mantidas em recipiente fechado durante 4 h, e então, submetidas à análise microbiológica, para análise da viabilidade bacteriana e para contagem do número de colônias/biofilmes de estreptococos do grupo mutans aderidas às cerdas.

#### *Avaliação microbiológica das escovas após uso de soluções de *M. glomerata* e *M. laevigata**

Após o período de secagem, as escovas dentais de cada etapa foram colocadas, individualmente, em tubos tipo Falcon (TPP, Trasadingen, Suíça) de 50 mL, contendo o meio de cultura CaSa B, em posição vertical, ficando as cerdas totalmente submersas no meio de cultura. Os tubos fechados foram incubados por 4

dias, a 37 °C.

Após o período de incubação, alíquotas de cada tubo foram submetidas à análise de viabilidade do biofilme por meio de ensaio colorimétrico do MTT. Em seguida, os tubos, com as respectivas escovas, foram incubados por mais 26 dias, a 37 °C, para a análise de número de colônias nas cerdas.

A análise de viabilidade do biofilme foi realizada de acordo com o descrito por Spolidorio et al. (41); Taji & Rogers (11), com modificações. Em resumo, três alíquotas de 100µL de cada tubo tipo Falcon foram transferidas para uma placa de 96 compartimentos e adicionados 10 µL de solução de MTT (5 mg/mL) (Sigma Chemical, St. Louis, Mo, USA), e posteriormente incubada pelo período adicional de 3 h. Ao final, as soluções do tratamento experimental e controle, foram adicionados 100 µL de uma solução de isopropanol acidificado em HCl a 40 µM. A leitura foi realizada em leitor de microplacas (TP-Reader, Thermoplate) no comprimento de onda de 595 nm. O percentual de inibição do crescimento microbiológico foi calculado em relação ao controle, realizado apenas com o ciclo normal de escovação e desinfecção.

Após 30 dias, as escovas dentais foram analisadas quanto à presença ou não de desenvolvimento de biofilme sobre a superfície das cerdas, com o auxílio de microscópio estereoscópico (Nikon – Japão), sob luz refletida. As escovas foram coradas com solução de safranina 0,1% (Vetec-Sigma-Aldrich, Duque de Caxias, Rio de Janeiro, Brasil) por 15 min, lavadas com PBS e secas ao ar (42,43). O número de colônia/biofilme aderido às cerdas foi avaliado por 3 observadores calibrados e expresso tendo como base os seguintes parâmetros: 0 (score 0): ausência de colônia/biofilme; 1 a 100 (score 1): quando foi possível efetuar a contagem exata do número de unidades formadoras de colônia/biofilme presentes; +100 (score 2): quando as colônias/biofilmes não se confluíram, possibilitando a contagem de valores superiores a 100 colônias; e incontável (score 3): quando o desenvolvimento bacteriano foi tão intenso, inclusive com colônias confluentes, impossibilitando a contagem exata do número de colônias/biofilmes de estreptococos do grupo mutans.

Como controle adicional, cinco escovas foram retiradas de suas embalagens originais e submetidas ao processamento microbiológico, sem serem utilizadas. Este procedimento foi realizado com o objetivo de verificar se as escovas dentais não apresentam contaminação oriunda do processo de fabricação industrial e embalagem.

Ao final do experimento, todas as crianças receberam escovas dentais novas e dentifrícios sem flúor. Também foi ministrada palestra educativa sobre controle mecânico do biofilme e sobre cuidados com as escovas dentais.

### *Análise estatística*

Dados do efeito antimicrobiano de extratos e soluções de *Mikania in vitro* e dados do tratamento com soluções de *Mikania* e clorexidina na desinfecção de escovas foram expressos como valores médios  $\pm$  erro padrão da média (SEM). Foi aplicado o teste de normalidade Shapiro-Wilk ambos os conjuntos de dados. Para análise do efeito antimicrobiano *in vitro*, e da concentração de cumarina, aplicou-se análise de variância *one way* (ANOVA). A significância estatística para a inibição do crescimento bacteriano foi determinada pelo teste *t* de Student. Diferenças foram consideradas significativas quando  $p < 0,05$ . Comparações entre os tratamentos para desinfecção de escovas foi aplicado Kruskal-Wallis *one way* ANOVA, seguido pelo teste de Dunn. Diferenças foram consideradas significativas quando  $p < 0,05$ . O teste estatístico não-paramétrico de Friedman para amostras vinculadas foi aplicado para verificação de possíveis diferenças entre as soluções, com relação à inibição ou não da formação do biofilme cariogênico sobre as cerdas das escovas após 30 dias. As análises estatísticas foram realizadas empregando-se o software livre Tanagra (<http://eric.univ-lyon2.fr/~ricco/tanagra/en/tanagra.html>).

### **Resultados**

As análises de teor de umidade por gravimetria, teor de cinzas por calcinação e material extraível em etanol por extração em soxhlet foram realizadas para o material vegetal e os resultados estão apresentados na Tabela 1.

Na quantificação da cumarina por HPLC, a equação da reta obtida por regressão linear para a curva padrão foi  $y = 14245586x - 6574,0$ . A faixa linear foi de 0,005 a 0,08 mg/mL, apresentando limite de detecção de 2,33 µg/mL e limite de quantificação de 7,76 µg/mL. O coeficiente de correlação (r) obtido foi de 0,9967. Os resultados da quantificação do teor de cumarina nas diferentes amostras estão descritos na Tabela 2.

A CIM do extrato de etanólico e a solução da *M. glomerata* na avaliação *in vitro* foi de 0,4 mg/mL e 1,25 %, respectivamente. A CIM do extrato de etanólico e a solução da *M. laevigata* foi de 0,4 mg/mL e 0,14 %, respectivamente.

Das 38 crianças selecionadas para este estudo, apenas 24 (63,16% das crianças) participaram das quatro etapas da pesquisa, devido ausência no ambiente escolar nos dias da pesquisa.

As colônias/biofilmes de estreptococos do grupo mutans estavam presentes no meio de cultura de todas as escovas dentais (100%) após uma única escovação.

Todas as soluções reduziram a formação de estreptococos do grupo mutans, clorexidina em  $50,7 \pm 17,7\%$ ; *M. glomerata* em  $37,3 \pm 23,7\%$  e *M. laevigata* em  $28,7 \pm 25,1\%$  de inibição em comparação com o grupo que recebeu apenas o ciclo normal de escovação e desinfecção com água. Não foi observada diferença no tratamento realizado com as soluções a base de guaco (*M. glomerata* e *M. laevigata*). Entretanto, o tratamento com a clorexidina a 0,12 % foi estatisticamente igual ao do tratamento com solução de *M. glomerata* e diferente do tratamento com a solução de *M. laevigata* no nível de confiança de 95%. Os resultados da avaliação microbiológica das escovas após o uso das soluções estão descritos na Figura 1.

O processamento microbiológico das cinco escovas novas não apresentou turvação durante os 30 dias de incubação. A avaliação da viabilidade microbiana avaliada no quarto dia de incubação não evidenciou crescimento bacteriano.

Na avaliação da colônia/biofilme após 30 dias de incubação observou-se que não houve diferença estatística entre os tratamentos utilizados, exibindo número de colônias/biofilmes maior que 100 presentes em todas as escovas dentais. Estes resultados estão descritos na Figura 2.



## Discussão

Neste estudo clínico randomizado, as crianças foram distribuídas em quatro grupos utilizando a tabela de números ao acaso, que é um dispositivo de aleatorização. O objetivo deste tipo de amostragem é minimizar a incorporação de vieses, que poderiam agir como fatores de confusão e interferir nos resultados obtidos. Todos têm igual probabilidade de pertencer à amostra, e todas as possíveis amostras têm também igual probabilidade de ocorrer.

Após a primeira escovação as escovas dentais podem ser contaminadas por diferentes tipos de bactérias, vírus, leveduras e parasitas intestinais provenientes da cavidade bucal ou do meio ambiente. A partir daí se busca mecanismos para desinfecção de escovas dentais testando inúmeras substâncias e equipamentos para evitar, sob condições usuais de armazenamento, a inoculação/reinoculação de microrganismos oportunistas ou patogênicos na cavidade bucal (7,12,13,16-18,44-49).

A cárie dental severa em crianças em idade pré-escolar está relacionada a uma microbiota bastante diversificada, estando o *S. mutans* entre as principais espécies associadas ao desenvolvimento da doença (4), justificando assim, a avaliação da contaminação das escovas dentais por este grupo de microrganismos no presente estudo uma vez que o controle da presença de *S. mutans* é fundamental para a manutenção da saúde bucal (50).

A transmissão da microbiota cariogênica pode ocorrer diretamente através da saliva ou por meio de objetos como escovas dentais, chupetas, próteses dentárias ou aparelhos ortodônticos removíveis (51-53), podendo servir como fonte para inoculação/reinoculação de microrganismos com potencial patogênico.

Além disso, o controle de contato salivar entre crianças em ambientes como creches, pré-escolas e outras instituições é difícil de ser realizado, podendo a escova ser trocada e/ou compartilhada, inadvertidamente (2,14). Assim, a desinfecção das escovas dentais poderia evitar a infecção cruzada, impedir a reinoculação de microrganismos e diminuir a contaminação de superfícies não

contaminadas, principalmente no período denominado por Caufield et al. (54) de primeira “janela de infectividade”. Por este motivo foi escolhida a faixa etária de 2 a 5 anos, idade pré-escolar, para avaliação da contaminação microbiana das escovas dentais após o uso.

O tempo escolhido neste trabalho foi de 1 minuto, considerando ser este o tempo suficiente para a contaminação das escovas dentais.

Alguns fatores promovem uma redução da contaminação das escovas dentais, como o tipo de creme dental utilizado na escovação (7), que podem ter na sua composição agentes antibacterianos (55) como o flúor e o triclosan (56,57). Por este motivo, não foi utilizado dentífrico durante a escovação, evitando interferências na contaminação das escovas por estreptococos do grupo mutans e na avaliação da eficácia das soluções testadas para desinfecção.

Um único profissional realizou a escovação dental, considerando que a amostra deste estudo era composta de crianças em idade pré-escolar e com pouca habilidade manual, reduzindo a interferência de fatores de confusão.

No presente estudo foi avaliada a contaminação das escovas por estreptococos do grupo mutans e a eficácia de quatro soluções (água, clorexidina a 0,12 %, solução de EMG a 2,5% e solução de EML a 2,5%) na desinfecção de escovas dentais de crianças de 2 a 5 anos, tendo a clorexidina (Periogard®) como controle positivo e a água como controle negativo. O Periogard® é um antisséptico à base de clorexidina a 0,12% disponível no comércio especializado. Apesar de alguns estudos mostrarem resultados mais promissores ao utilizarem a clorexidina na desinfecção de escovas dentais (19,58,59), nossos resultados mostraram que a solução de clorexidina reduziu  $50,7 \pm 17,7\%$  a formação de estreptococos do grupo mutans. Isso poderia ser explicado pela aplicação de diferentes metodologias, uma vez que a utilização do método colorimétrico de MTT proporciona descobrir a viabilidade de todas as bactérias presentes nas escovas, mesmo quando ainda não se formou a colônia. O ensaio colorimétrico do MTT é um método com elevado grau de precisão e rápido.

A solução de *M. glomerata* apresentou a mesma eficácia da clorexidina, considerada padrão ouro. Tendo em vista as desvantagens da clorexidina

(manchamento dos dentes, perda do paladar, sensação de boca ardente, descamações da mucosa e reações alérgicas ocasionais), a *M. glomerata* poderia ser útil nos programas de estratégia de fitoterápicos contra estreptococos do grupo mutans (ARAÚJO BRITTO et al., 2009).

A desinfecção das escovas pode ser pela imersão das mesmas em soluções antimicrobianas (44-46,58,60) porém, a aplicação dessas substâncias na forma de spray se torna um método mais prático e econômico podendo um único frasco ser utilizado por várias pessoas. Por este motivo, as soluções utilizadas neste estudo foram acondicionadas em frascos plásticos na forma de spray (18,48).

As escovas depois de borrifadas com as soluções teste foram mantidas por 4 horas à temperatura ambiente, para secagem, simulando o intervalo médio entre as escovações (61).

A técnica microbiológica de imersão das escovas em meio de cultura líquida foi utilizada para avaliar a contaminação das escovas dentais por estreptococos do grupo mutans, na forma de colônias/biofilmes sobre as cerdas. O meio de cultura utilizado foi o CaSa B, que é seletivo enriquecedor, pois contém sacarose (substrato para estreptococos do grupo mutans) além da bacitracina, antibiótico que limita o crescimento de outros tipos de microrganismos (18,57,58).

O resultado de 100% de culturas positivas nas escovas de dente do grupo controle deste trabalho, onde foi borrifada apenas água, reforça a necessidade de desinfecção das escovas após sua utilização, já que o intervalo de 4 horas de secagem entre as escovações não é suficiente para eliminação dos microrganismos.

As escovas dentais podem ser contaminadas por outras bactérias, vírus, fungos e parasitas intestinais além dos microrganismos cariogênicos e dessa forma ser fonte de disseminação destes patógenos (7,45,62). A escovação comumente promove bacteriemias transitórias (8,63-66) fato relevante quando relacionado com indivíduos imunodeprimidos, transplantados e cardiopatas. O desconhecimento geral da contaminação das escovas dentais após a primeira escovação justifica a falta de cuidados com a mesma, que necessita de formas adequadas de armazenagem e desinfecção.

O conhecimento e orientação dos alunos de graduação em Odontologia e cirurgias-dentistas são necessários considerando serem estes referências e multiplicadores em ações de promoção de saúde bucal, podendo orientar seus pacientes, além de como escolher a escova mais indicada e quando trocá-la, mas também da importância do armazenamento apropriado e desinfecção das mesmas.

As espécies *M. glomerata* e a *M. laevigata* apresentaram teor de umidade e cinzas dentro do limite descrito na Farmacopéia Brasileira (67), de máximo de 10% e 15%, respectivamente para *M. laevigata* e também compatíveis com o descrito por Bolina et al. (39). As amostras de *M. laevigata* apresentaram teores de cumarina (Tabela 2) de acordo com os exigido pela Farmacopéia Brasileira (67) para o guacocheroso (mín. 0,1%). Para o extrato e solução não foram encontrados dados de comparação. A cumarina não foi detectada nas amostras de *M. glomerata*, porém estava abaixo do limite de quantificação. A presença de cumarina em amostras de *M. glomerata* tem sido relatada em diversos artigos (37,39,68), assim também com a não detecção deste marcador (29).

A eficácia da ação antimicrobiana do guaco (*M. glomerata* e *M. laevigata*) deste estudo foi inferior ao previamente relatado (32), fato que pode estar relacionado com a composição química e forma de preparação do extrato e da solução. Entretanto, a eficácia das soluções de guaco, principalmente o preparado com *M. glomerata*, como agentes de desinfecção de escova é relatado pela primeira vez no presente estudo. A atividade antimicrobiana de *M. glomerata* relatada por Yatsuda et al. (32) não estava correlacionada com a presença de cumarina no extrato, fato também observado neste estudo. As soluções de guaco reduziram o número de colônias/biofilmes nas escovas incubadas por 30 dias, sugerindo que o efeito destas soluções permaneceria durante o tempo de armazenamento das escovas durante o uso normal.

Com base nos resultados do presente estudo, pode-se concluir que a solução de *M. glomerata* a 2,5 % e de *M. laevigata* diminuíram a contaminação das escovas dentais por estreptococos do grupo mutans sendo que a *M. glomerata* apresentou a mesma eficácia da clorexidina (padrão ouro). A *M. glomerata* poderia ser útil nos programas de estratégia de fitoterápicos contra estreptococos do grupo mutans e que o marcador cumarina não está relacionado com a atividade observada.

## Agradecimentos

Os autores agradecem a FAPES (Fundação de Amparo à Pesquisa do Espírito Santo, Processo nº 45422648/09) pelo financiamento recebido. A FAPES e o PIBIT-Ifes (Programa Institucional de Bolsas de Iniciação em Desenvolvimento Tecnológico e Inovação) também são agradecidos pela bolsa de iniciação científica. Agradece-se a Mírian de Almeida Silva pelo apoio durante as coletas. Agradece-se à FUNADESP (Fundação Nacional de Desenvolvimento do Ensino Particular Superior) e a UVV (Universidade Vila Velha) pelas bolsas de estudos dos autores F.C.R.Lessa e D.E.Endringer.

## Referências

1. GRIMOUD AM, LUCAS S, SEVIN A, GEORGES P, PASSARRIUS O, DURANTHON F. Frequency of dental caries in four historical populations from the chalcolithic to the middle ages. *Int Dent J* 2011; **2011**: 1-7
2. KUMARIHAMY SL, SUBASINGHE LD, JAYASEKARA P, KULARATNA SM, PALIPANA PD. The prevalence of Early Childhood Caries in 1-2 yrs olds in a semi-urban area of Sri Lanka. *BMC Res Notes* 2011; **4**: 336.
3. PAULA JS, LEITE IC, ALMEIDA AB, AMBROSANO GM, PEREIRA AC, MIALHE FL. The influence of oral health conditions, socioeconomic status and home environment factors on schoolchildren's self-perception of quality of life. *Health Qual Life Outcomes* 2012; **10**: 6.
4. TANNER ACR, MATHNEY JMJ, KENT RL, CHALMERS NI, HUGHES CV, LOO CY, PRADHAN N, KANASI E, HWANG J, DAHLAN MA, PAPADOPOLOU E, DEWHIRST FE. Cultivable anaerobic microbiota of severe early childhood caries. *J. Clin Microbiol* 2011; **49**: 1464-1474.

5. SPOLIDORIO DMP, GOTO E, NEGRINI TC, SPOLIDORIO LC. Viability of *Streptococcus mutans* on transparent and opaque toothbrushes. *J Dent Hyg* 2003; **77**: 114-117.
6. BUNETEL L, TRICOT-DOULEX S, AGNANIG, BONNAURE-MALLET M. In vitro evaluation of the retention of three different types of toothbrush. *Oral Microbiol Immunol* 2000; **15**: 313- 316.
7. QUIRYNEN M, De SOETE M, PAUWELS M, GIZANI S, VAN MEERBEEK B, VAN STEENBERGHE D. Can toothpaste or a toothbrush with antibacterial tufts prevent toothbrush contamination? *J Periodontal* 2003; **74**: 312-322.
8. KENNEDY HF, MORRISON D, TOMLINSON D, GIBSON BES, BAGG J, GEMMELL CG. Gingivitis and toothbrushes: potential roles in viridans streptococcal bacteraemia. *J Infect* 2003; **46**: 67-70.
9. DITMYER MM, DOUNIS G, HOWARD KM, MOBLEY C, CAPPELLI D. Validation of a multifactorial risk factor model used for predicting future caries risk with Nevada adolescents. *BMC Oral Health* 2011; **11**: 18.
10. PARK YS, AHN JS, KWON HB, LEE SP. Current status of dental caries diagnosis using cone beam computed tomography. *Imaging Sci Dent* 2011; **41**: 43-51.
11. TAJI SS, ROGERS AH. The microbial contamination of toothbrushes. A pilot study. *Aust Dent J* 1998; **43**: 128-130.
12. CHAVES RAC, RIBEIRO DML, ZAIA JE, ALVES EG, SOUZA MGM, MARTINS CHG, MESTRINER SF. Evaluation of antibacterial solutions in the decontamination of toothbrushes collected from preschool students. *Rev Odontol UNESP* 2007; **36**: 29-33.
13. FRATTO G, NAZZICONE M, ORTOLANI E. Disinfezione degli spazzolini dentali. Ricerca sperimentale. *Prev Assist Dent* 1990; **16**:7-10.

14. MALMBERG E, BIRKHED D, NORVENIOUS G, NORÉN JG, DAHLÉN G. Microorganisms on toothbrushes at day-care centers. *Acta Odontol Scand* 1994; **52**: 93– 98.
15. DEVINE D, PERCIVAL RS, WOOD DJ, TUTHILL TJ, KITE P, KILLINGTON RA, MARSH PD. Inhibition of biofilms associated with dentures and toothbrushes by tetrasodium EDTA. *J. Appl Microbiol* 2007; **103**: 2516-2524.
16. QUIRYNEN M, De SOETE M, PAUWELS M, GOOSSENS K, TEUGHEL S W, VAN ELDERE J, VAN STEENBERGHE D. Bacterial survival rate on tooth and interdental brushes in relation to the use of toothpaste. *J Clin Periodontol* 2001; **28**:1106-1114.
17. NEAL PR, RIPPIN JW. The efficacy of a toothbrush disinfectant spray – an in vitro study. *J Dent* 2003; **31**:153- 157.
18. SATO S, ITO YI, LARA EHG, PANZERI H, ALBURQUERQUE JÚNIOR RF, PEDRAZZI V. Bacterial survival rate on toothbrushes and their decontamination with antimicrobial solutions. *J Appl Oral Sci* 2004; **12**:1-9.
19. NELSON-FILHO P, SILVA LA, SILVA RA, SILVA LL, FERREIRA PD, ITO IY. Efficacy of microwaves and chlorhexidine on the disinfection of pacifiers and toothbrushes: an in vitro study. *Pediatr Dent* 2011; **33**:10-13.
20. JEON JG, ROSALEN PL, FALSETTA ML, KOO H. Natural products in caries research: current (limited) knowledge, challenges and future perspective. *Caries Res* 2011; **45**: 243-263.
21. PEREIRA JB. Atividade antimicrobiana do extrato hidroalcoólico da *Punica granatum* Linn. sobre microrganismos formadores de placa bacteriana. *Rev. Odontol Cien.* 2004; **4**: 265.
22. PEREIRA JV, PEREIRA MSV, SAMPAIO FC, SAMPAIO MCC, ALVES PM, ARAÚJO CRF, HIGINO JS. Efeito antibacteriano e antiaderente in vitro do extrato da *Punica granatum* Linn. sobre microrganismos do biofilme dental. *Rev Bras Farmacogn* 2006 **16**: 88-93.

23. OLIVEIRA FQ, GOBIRA B, GUIMARÃES C, BATISTA J, BARRETO M, SOUZA M. Espécies vegetais indicadas na odontologia. *Rev Bras Farmacogn* 2007; **17**: 466-476.
24. NGUEYEM TA, BRUSOTTI G, MARRUBINI G, GRISOLI P, DACARRO C, VIDARI G, FINZI PV, CACCIALANZA G. Validation of use of a traditional remedy from *Bridelia grandis* (Pierre ex Hutch) stem bark against oral Streptococci. *Journal of Ethnopharmacol* 2008; **120**: 13-16.
25. BOTSARIS. A. S. *As Fórmulas Mágicas das Plantas*. Rio de Janeiro: Editora Nova Era, 1997; 417- 419.
26. DAVINO SC, GIESBRECHT AM, ROQUE NF. Antimicrobial activity of kaurenoic acid derivatives substituted on carbon-15. *Brazilian J Med Biol Res* 1989; **22**: 1127-1129.
27. MATOS FJA. *Farmácias vivas: sistema de utilização de plantas medicinais projetado para pequenas comunidades*, 3th ed. Fortaleza: UFC, 1998.
28. MEDEIROS JD, KANIS LA. Avaliação do efeito de polietilenoglicóis no perfil de extratos de *Mikania glomerata* Spreng., Asteraceae, e *Passiflora edulis* Sims, Passifloraceae. *Rev Bras Farmacogn* 2010; **20**: 796-802.
29. BERTOLUCCI SK, PEREIRA AB, PINTO JE, AQUINO RIBEIRO JÁ, OLIVEIRA AB, BRAGA FC. Development and validation of an RP-HPLC method for quantification of cinnamic acid derivatives and kaurane-type diterpenes in *Mikania laevigata* and *Mikania glomerata*. *Planta Med* 2009; **75**: 280-285.
30. SANTOS TC, TOMASSINI TCB, CABRAL LM. Estudos preliminares sobre a constituição química e atividade antimicrobiana de *Mikania glomerata* Sprengel. *Rev Bras Farmacogn* 1998; **79**: 54-55.
31. DUARTE MCT, FIGUEIRA GM, SARTORATTO A, REHDER VLG, DELARMELENA C. Anti-Candida activity of brazilian medicinal plants. *J Ethnopharmacol* 2005; **97**: 305-311.



32. YATSUDA R, ROSALEN PL, CURY JA, MURATA RM, REHDER VL, MELO LV, KOO H. Effects of Mikania genus on growth and cell adherence of mutans streptococci. *J Ethnopharmacol* 2005; **97**: 183-189.
33. SÁ RCS, MAGDA NL, ALMEIDA RN. Toxicological screening of *Mikania glomerata* Spreng., Asteraceae, extract in male Wistar rats reproductive system, sperm production and testosterone level after chronic treatment. *Rev Bras Farmacogn* 2010; **20.5** : 718-728.
34. SÁ RCS, LEITE MN, REPOREDO MM, ALMEIDA RN. Evaluation of long-term exposure to *Mikania glomerata* (Sprengel) extract on male Wistar rats' reproductive organs, sperm production and testosterone level. *Contraception* 2003; **67**: 327-331.
35. COSTA RJ, DINIZ A, MANTOVANI MS, JORDÃO BQ. In vitro study of mutagenic potential of *Bidens pilosa* Linné and *Mikania glomerata* Sprengel using the comet and micronucleus assays. *J Ethnopharmacol* 2008; **118**: 86-93.
36. SÁ RCS, LEITE MN, PETERS MV, GUERRA MO, ALMEIDA RN. Absence of mutagenic effect of *Mikania glomerata* hidroalcoholic extract on adult Wistar rats in vivo. *Braz. Arch. Biol. Technol* 2006; **49**: 599-604.
37. CASTRO EM, PINTO JEP, BERTOLUCCI SKV, MALTA MR, CARDOSO MG, SILVA. Coumarin Contents in Young *Mikania glomerata* Plants ( Guaco ) under Different Radiation Levels and Photoperiod. *Acta Farm. Bonaerense* 2006; **25**: 387-392.
38. WHO. World Health Organization Quality control methods for medicinal plant materials. Geneva: World Health Organization, 1998. 122p.
39. BOLINA RC, GARCIA EF, DUARTE MGR. Estudo comparativo da composição química das espécies vegetais *Mikania glomerata* Sprengel e *Mikania laevigata* Schultz Bip ex Baker. *Rev Bras Farmacogn* 2009; **19**: 294-298.
40. SPOLIDORIO DMP, TARDIVO TA, DOS REIS DERCELI J, NEPPELENBROEK KH, DUQUE C, SPOLIDORIO LC, PIRES JR. Evaluation of two alternative methods for disinfection of toothbrushes and tongue scrapers. *Int J Dent Hyg* 2011; **9**: 279-283.

41. STARKEY P. Instructions to parents for brushing the child's teeth. *J Dent Child* 1961; **28**: 42- 47.
42. LEMBKE C, PODBIELSKI A, HIDALGO-GRASS C, JONAS L, HANSKI E, KREIKEMEYER B. Characterization of Biofilm Formation by Clinically Relevant Serotypes of Group A Streptococci. *Appl Environ Microbiol* 2006; **72**: 2864- 2875.
43. STANDAR K, KREIKEMEYERB, REDANZ S, MÜNTER WL, LAUE M, PODBIELSKI A. Setup of an in vitro test system for basic studies on biofilm behavior of mixed-species cultures with dental and periodontal pathogens. *PloS one* 2010; **5**: 1-14.
44. COBB CM. The toothbrushes as a cause of repeated infections of the mouth. *Boston Med Surg J* 1920; **183**: 263- 264.
45. FEO M. Supervivencia y desinfeccion de *Candida albicans* en el cepillo de dientes. *Mycopathologia* 1981; **74**: 129-134.
46. CAUDRY SD, KLITORINOS A, CHAN ECS. Contaminated toothbrushes and their disinfection. *J Can Dent Assoc* 1995; **61**: 511– 516
47. GLASS RT, FURGASON M, MOODY J. Effectiveness of an ultra-violet light toothbrush sanitizer on three microorganism. *J Dent Res* 1996; **75**: 417.
48. MEIER S, COLLIER C, SCALETA MG, STEPHENS J, KIMBROUGH R, KETTERING JD. An in vitro investigation of the efficacy of CCP for use in toothbrush decontamination. *J Dent Hyg* 1996; **70**: 161-165.
49. GLASS RT, FURGASON M, MOODY J. In vivo study of the efficacy of an ultra-violet toothbrush sanitizer. *J Dent Res* 1997; **76**: 385.
50. ROSA OPS, SANCHES FAC. Transmissibilidade de estreptococos mutans de mãe para filho e prevenção. *Rev Dent Press Biol Oral* 2000; **1**: 37-50.
51. KÖHLER B, BRATTHALL D. Intrafamilial levels of *streptococcus mutans* and some aspects of the bacterial transmission. *J Dent Res* 1978; **86**: 35- 42.

52. TEDJOSASONGKO U, KOZAI K. Initial acquisition and transmission of mutans streptococci in children at day nursery. *J Dent Child* 2002; **69**: 284- 288.
53. LESSA FC, ENOKI C, ITO IY, FARIA G, MATSUMOTO MA, NELSON-FILHO P. In-vivo evaluation of the bacterial contamination and disinfection of acrylic baseplates of removable orthodontic appliances. *Am J Orthod Dentofacial Orthop* 2007;**131**:705.e11-17.
54. CAUFIELD PW, CUTTER GR, DASANAYAKE AP. Initial acquisition of mutans streptococci by infants: evidence for a discrete window of infectivity. *J Dent Res* 1993; **72**: 37-45.
55. MOTZFELD R, HUERTA J, APIP A, ARAYA E. Tipo y grado de contaminación por bacterias bucales y levaduras de cepillos dentales con uso habitual. *Rev Fac Odontol Univ Chile* 1999; **17**: 9- 14.
56. VERRAN J, LEAHY-GILMARTIN A, WATSON GK, HAMMOND K, HUNTINGTON E, RAVEN SJ. Microbial contamination of toothbrushes during an in-home trial. *J Dent Res* 1997; **76** (Special Issue): 437.
57. NELSON-FILHO P, ISPER AR, ASSED S, FARIA G, ITO IY. Effect of triclosan dentifrice on toothbrush contamination. *Pediatr Dent* 2004; **26**:11- 16.
58. NELSON-FILHO P, MACARI S, FARIA G, ASSED S, ITO IY. Microbial contamination of toothbrushes and their decontamination. *Pediatr Dent* 2000; **22**: 381-384.
59. NELSON-FILHO P, FARIA G, SILVA RA, ROSSIMA, ITO IY. Evaluation of the contamination and disinfection methods of toothbrushes used by 24- to 48-month-old children. *J Dent Child (Chic)* 2006; **73**:152-158.
60. WHITLEY R, GILMORE E. Contaminated toothbrushes and their disinfection. *J Dent Res* 1973; **52**(Special Issue): 218.
61. WARREN DP, GOLDSCHIMIDT MC, THOMPSON MB, ADLER-STORTHZ K, KEENE HJ. The effects of toothpastes on the residual microbial contamination of toothbrushes. *J Am Dent Assoc* 2001; **132**:1241- 1245.

62. GLASS RT, JENSEN HG. More on the contaminated toothbrushes: the viral story. *Quintessence Int* 1988; **19**: 713-716.
63. SCONYERS JR, CRAWFORD JJ, MORLARTY JD. Relationship of bacteremia to toothbrushing in patients with periodontitis. *J Am Dent Assoc* 1973; **87**: 616-22.
64. GLASS RT, MARTIN ME, PETERS LJ. Transmission of disease in dogs by toothbrushing. *Quintessence Int* 1989; **20**: 819- 824.
65. MÜLLER HP, LANGE DE, MÜLLER RF. *Actinobacillus Actinomycetemcomitans* contamination of toothbrushes from patients harbouring the organism. *J Clin Periodontol* 1989; **16**: 388- 389.
66. RAMLI R. Toothbrush contamination. *Aust Dent J* 1998; **43**: 368.
67. FARMACOPEIA BRASILEIRA 4<sup>th</sup>. Rio de Janeiro: Atheneu, 2005.
68. BRAZ R, WOLF LG, LOPES GC, MELLO JCP. Quality control and TLC profile data on selected plant species commonly found in the Brazilian market. *Rev Bras Farmacogn* 2011; *apud a head*

## Tabelas

Tabela 1. Resultado das análises farmacognósticas de *Mikania glomerata* e *Mikania laevigata*.

Ensaio	<i>M. glomerata</i> (% m/m)	<i>M. laevigata</i> (% m/m)
%Umidade	8,4 ± 0,2	7,7 ± 0,2
%Cinzas	2,2 ± 0,2	7,9 ± 0,2
%Extraíveis	47,3 ± 2,1	44,0 ± 1,3

Tabela 2. Concentração de cumarina na matéria prima vegetal, no extrato e na solução de *M. glomerata* e *M. laevigata* por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE).

Amostra	<i>M. glomerata</i>	<i>M. laevigata</i>
Matéria- prima vegetal	> LQ	0,12 ± 0,02 %
Extrato etanólico	> LQ	0,32 ± 0,05 %
Colutório a 2,5 % de extrato etanólico	> LD	0,04 ± 0,00 %

LD (limite de detecção) = 2,33 µg/mL, LQ (limite de quantificação) = 7,76 µg/mL

## Figuras

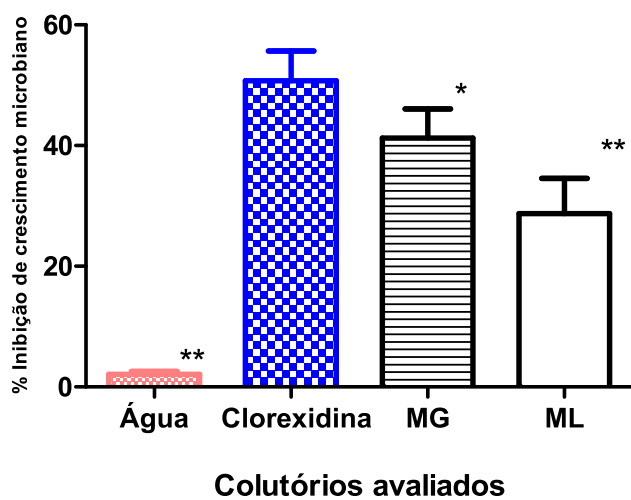


Figura 1. Avaliação microbiológica das escovas dentais após uso das soluções. MG (*Mikania glomerata*) \* semelhante à clorexidina ( $p > 0,05$ ), ML (*Mikania laevigata*) e água \*\* diferentes da clorexidina ( $p > 0,05$ ).

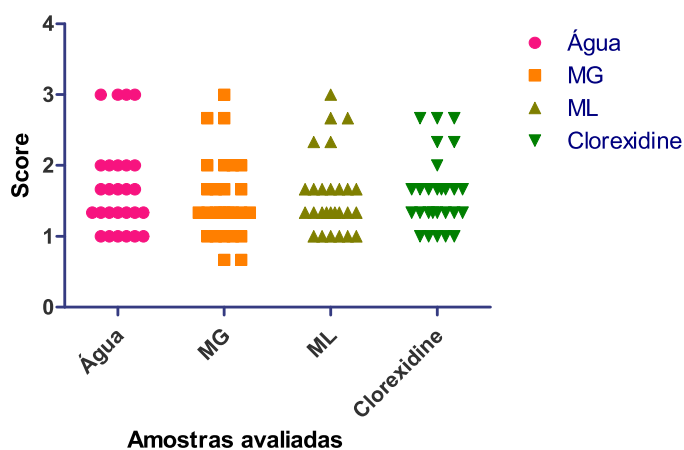


Figura 2. Avaliação de colônias/biofilmes nas escovas dentais após 30 dias. MG (*Mikania glomerata*), ML (*Mikania laevigata*).

#### 4 CONCLUSÃO

De acordo com os resultados obtidos neste estudo clínico aleatório, pôde-se concluir que:

- Após uma única escovação de 1 minuto todas as escovas dentais utilizadas por crianças em idade pré-escolar (100,0%) tornaram-se contaminadas por estreptococos do grupo mutans;
- As soluções testadas reduziram a formação de estreptococos do grupo mutans (clorexidina  $50,7 \pm 17,7\%$ ; *M. glomerata*  $37,3 \pm 23,7\%$  e *M. laevigata*  $28,7 \pm 25,1\%$  de inibição). O tratamento com a solução de *M. glomerata* não diferiu estatisticamente da clorexidina, enquanto a de *M. laevigata* apresentou diferença significativa ( $p < 0,05$ ) com o controle positivo.
- A solução de *M. glomerata* poderia ser útil nos programas de estratégia de fitoterápicos contra bactérias orais cariogênicas, uma vez que teve eficácia semelhante à clorexidina (padrão ouro).

## 5 REFERÊNCIAS

### Referências empregadas na Introdução

ALMEIDA, J.M.; SANTANA, R.; ROCHA, L.M.; SANTOS, E.V.M. e SHARAPIN, N. Processo de fabricação e determinação do prazo de validade do xarope de guaco – *Mikania glomerata* Spreng. *XV Simpósio de Plantas Medicinais do Brasil*. Águas de Lindóia, São Paulo, Resumo 07.017, pp. 187. 1998.

ARAÚJO BRITTO, I. M. P.; CALIL, C. M.; MÜLLER, V. M.; PANNUTI, C. M.; PUSTIGLIONI, F.E. O uso de enxaguatórios bucais no controle da halitose. **R. Periodontia**, v. 19(4):61-67, 2009.

AREIAS, C. M.; SAMPAIO-MAIA, B.; GUIMARAES, H.; MELO, P.; ANDRADE, D. Caries in Portuguese children with Down syndrome. **Clinics**, 66(7), 1183-1186. doi:10.1590/S1807-59322011000700010, 2011.

BERTOLUCCI, S. K.; PEREIRA, A.B.; PINTO, J. E.; AQUINO RIBEIRO, J. A. de; OLIVEIRA, A. B. de; BRAGA F. C. Development and validation of an RP-HPLC method for quantification of cinnamic acid derivatives and kaurane-type diterpenes in *Mikania laevigata* and *Mikania glomerata*. **Planta medica**, v. 75, n. 3, 280-285, 2009.

BARBOSA, B. M. C. **Avaliação da contaminação microbiana e eficácia de agentes antimicrobianos na desinfecção de escovas dentais de pacientes portadores de necessidades especiais** [dissertação]. Ribeirão Preto: FORP - Univ. de São Paulo; 2003.

BOTSARIS, A. S. **As Fórmulas Mágicas das Plantas**. Rio de Janeiro: Editora Nova Era, 1997. p. 417-419.

BRANDÃO, M. G. L. (Org.). **Plantas medicinais & fitoterapia**. Belo Horizonte: Faculdade de Farmácia da UFMG, 2003. 140p.

BRASIL, Ministério da Saúde, Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução RDC nº 48, de 16 de março de 2004<sup>a</sup>. Dispõe sobre o registro de medicamentos fitoterápicos. **Diário Oficial da União**, Brasília, 18 mar 2004a.

BRASIL, Ministério da Saúde, Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução RDC nº 48, de 16 de março de 2004. Dispõe sobre o registro de medicamentos fitoterápicos. **Diário Oficial da União**, Brasília, 18 mar 2004b.

BRASIL, Ministério da Saúde, Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução RDC nº 14, de 31 de março de 2010. Dispõe sobre o registro de medicamentos fitoterápicos. **Diário Oficial da União**, Brasília, 05 abr 2010.

BUFFON, M. C. M.; LIMA, M. L. C.; GALARDA, I.; COGO, L. Avaliação da eficácia dos extratos de *Malva sylvestris*, *Calendula officinalis*, *Plantago major* e *Curcuma*



zedoarea no controle do crescimento das bactérias da placa dentária. Estudo “in vitro”. **Revista Visão Acadêmica** 2: 31-38, 2001.

BUNETEL, L.; TRICOT-DOULEX, S.; AGNANI, G.; BONNAURE-MALLET, M. In vitro evaluation of the retention of three different types of toothbrush. **Oral Microbiol Immunol**, 15:313-6, 2000.

BUTLER, M. S. Natural products to drugs: natural product derived compounds in clinical trials. **Nat. Prod. Rep.**, 22, p. 162 - 195, 2005.

CAUDRY, S. D.; KLITORINOS, A.; CHAN, E. C. S. Contaminated toothbrushes and their disinfection. **J Can Dent Assoc**, 61:511–6, 1995.

CHIAPINOTTO, G. A.; MELLER, D.; SANTOS, F. B. Avaliação de meios mecânicos de limpeza. **RGO**; 49:161-4, 2001.

CHIBEBE JÚNIOR, J. Avaliação da esterilização de escovas dentais em forno de microondas (estudo *in vitro*) [abstract]. **Pesq Odontol Bras**, 16:182, 2002.

COBB, C. M. The toothbrushes as a cause of repeated infections of the mouth. Boston **Med Surg J**, 183:263-4, 1920.

COSTA, R. de J.; DINIZ, A.; MANTOVANI, M.S.; JORDÃO, B.Q. In vitro study of mutagenic potential of *Bidens pilosa* Linné and *Mikania glomerata* Sprengel using the comet and micronucleus assays. **J Ethnopharmacol.**, v. 118, n. 1, p. 86-93, 2008.

CRIDDLE, D.N.; SOARES de MOURA, R.S. de; LOPES, C.S.; CARVALHO, L. C. R. M. Efeito de guaco (*Mikania glomerata*) em leito vascular mesentérico (LVM) de rato. XIV **Simpósio de Plantas Medicinais do Brasil**. Florianópolis, Santa Catarina, Resumo F-109, pp.110. 1996

DAVINO, S. C.; GIESBRECHT, A. M.; ROQUE, N. F. Antimicrobial activity of kaurenoic acid derivatives substituted on carbon-15. **Brazilian J. Med. Biol. Res.** 22: 1127-1129. 1989

DEVINE, D. A.; PERCIVAL, R. S.; WOOD, D. J.; TUTHILL, T. J.; KITE, P.; KILLINGTON, R. A.; MARSH, P. D. Inhibition of biofilms associated with dentures and toothbrushes by tetrasodium EDTA. **Journal of applied microbiology**, 103(6), 2516-24. doi:10.1111/j.1365-2672.2007.03491.x, 2007.

DITMYER, M. M.; DOUNIS, G.; HOWARD, K. M.; MOBLEY, C.; CAPPELLI, D. Validation of a multifactorial risk factor model used for predicting future caries risk with Nevada adolescents. **BMC oral health**, 11(1), 18. BioMed Central Ltd. doi:10.1186/1472-6831-11-18, 2011.

DUARTE, M. C. T.; FIGUEIRA, G. M.; SARTORATTO, A.; REHDER, V. L. G.; DELARMELENA, C. Anti-Candida activity of brazilian medicinal plants. **Journal of Ethnopharmacology**. v. 97, p. 305-311, 2005.

FABRICANT, D. S.; FARNSWORTH, N. R. The value of plants used in traditional medicine for drug discovery. **Environ. Health Perspect.**, 109, p. 69 - 75, 2001.

FEO, M. Supervivencia y desinfección de *Candida albicans* en el cepillo de dientes. **Mycopathologia**, 74: 129-34, 1981.

FRATTO, G.; NAZZICONE, M.; ORTOLANI, E. Disinfección de los cepillos dentales. **Ricerca sperimentale**. *Prev Assist Dent* 1990; 16:7-10.

GLASS, R. T.; CARSON, S. R.; BARKER, R. L.; PEIPER, S. C.; SHAPIRO, S. Detection of HIV proviral DNA on toothbrushes: a preliminary study. **Okla Dent Assoc J**, 84:17-20, 1994.

GLASS, R. T.; FURGASON, M.; MOODY, J. Effectiveness of an ultra-violet light toothbrush sanitizer on three microorganism [abstract]. **J Dent Res**, 75:417, 1996.

GLASS, R. T.; FURGASON, M.; MOODY, J. *In vivo* study of the efficacy of an ultra-violet toothbrush sanitizer [abstract]. **J Dent Res**, 76:385, 1997.

GRAÇA, C.; BAGGIO, C.H.; FREITAS C.S.; RATTMANN, Y.D.; SOUZA, L.M.; CIPRIANI, T.R.; SASSAKI, G.L.; RIECK, L.; PONTAROLO, R.; SILVA-SANTOS, J.E.; MARQUES, M.A.. In vivo assessments of safety mechanism underlying in vitro relaxation induced by *Mikania laevigata* Schultz Bip. ex Baker in the rat trachea. **Journal of Ethnopharmacology**. v. 112, p. 430-439, 2007.

GRIMOUD, A. M.; LUCAS, S.; SEVIN, A.; GEORGES, P.; PASSARRIUS, O.; Duranthon, F. Frequency of dental caries in four historical populations from the chalcolithic to the middle ages. **International journal of dentistry**, 2011(i), 519691. doi:10.1155/2011/519691

IPEMA. Instituto de Pesquisas da Mata Atlântica. **Conservação da Mata Atlântica no Estado do Espírito Santo: cobertura florestal e unidades de conservação** (Programa Centros para a Conservação da Biodiversidade- Conservação Internacional do Brasil)/IPEMA. Vitória-ES: IPEMA, 2005. 142 p. KAUFFMANN, J. H. A study of the toothbrush. **Dent Cosmos**, 66:300-13, 1924.

KENNEDY, H. F.; MORRISON, D.; TOMLINSON, D.; GIBSON BES; BAGG, J.; GEMMELL, C. G. Gingivitis and toothbrushes: potential roles in viridans streptococcal bacteraemia. **J Infect**, 46:67-70, 2003.

KRASSE, B. **Risco de cárie - Um guia prático para avaliação e controle**. 2. ed. São Paulo : Quintessence, 1988.

KUMARIHAMY, S. L.; SUBASINGHE, L. D.; JAYASEKERA, P.; KULARATNA, S. M.; PALIPANA, P. D. The prevalence of Early Childhood Caries in 1-2 yrs olds in a semi-urban area of Sri Lanka. *BMC research notes*, 4(1), 336. **BioMed Central Ltd**. doi:10.1186/1756-0500-4-336, 2011.

KUMARIHAMY, S. L.; SUBASINGHE, L. D.; JAYASEKERA, P.; KULARATNA, S. M.; PALIPANA, P. D. "The prevalence of Early Childhood Caries in 1-2 yrs olds in a semi-urban area of Sri Lanka." **BMC research notes** 4.1 (2011): 336. Web. 20 Jan. 2012.

LARA, E. H. G.; ITO, I. Y.; OGASAWARA, M. S.; SEMPRINI, M.; PANZERI, H. Avaliação da eficiência de algumas soluções anti-sépticas para sanitização de escovas dentais. **Rev Assoc Bras Odontol**, 9:18-23, 2001.

LEHMER E.; APPLETON, J. L. T. Care of the toothbrush. **J Dent Res**, 11:530, 1931.

LIMA, N. P.; BIASI, L. A.; ZANETTE, F.; NAKASHIMA, T. Estaquia semilenhosa e análise de metabólitos secundários de guaco *Mikania gloemerata* Sprengel e *Mikania laevigata* Schultz Bip. Ex Baker. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**. V. 5, n. 2, p. 47-54, abr. 2003.

LONG, S. R.; SANTOS, A. S.; NASCIMENTO, C. M. O. Avaliação da contaminação de escovas dentais por enterobactérias. **Rev Odontol Univ St Amaro**, 5:21-5, 2000.

MACARI, S. **Eficácia de soluções antimicrobianas, na forma de spray, para a desinfecção de escovas dentais de crianças** [dissertação]. Ribeirão Preto: FORP - Univ. de São Paulo; 2002.

MALMBERG, E.; BIRKHED, D.; NORVENIOUS, G.; NORÉN, J. G.; DAHLÉN, G. Microorganisms on toothbrushes at day-care centers. **Acta Odontol Scand**, 52:93-8, 1994.

MATOS, F. J. A. **Farmácias vivas: sistema de utilização de plantas medicinais projetado para pequenas comunidades**. 3.ed. Fortaleza: UFC, 1998.

MEIER, S.; COLLIER, C.; SCALETA, M. G.; STEPHENS, J.; KIMBROUGH, R.; KETTERING, J. D. An *in vitro* investigation of the efficacy of CCP for use in toothbrush decontamination. **J Dent Hyg**, 70:161-51996.

NEAL P. R.; RIPPIN, J. W. The efficacy of a toothbrush disinfectant spray – an *in vitro* study. **J Dent**, 31:153-7, 2003.

NELSON, E.; GLASS, R. The ability of different toothbrush types to retain microorganisms. **IADR Abstratc form**; 1989.

NELSON-FILHO, P.; ISPER, A. R.; ASSED, S.; FARIA, G.; ITO, I. Y. Effect of triclosan dentifrice on toothbrush contamination. **Pediatr Dent**, 26:11-6, 2004.

NELSON-FILHO, P.; MACARI, S.; FARIA, G.; ASSED, S.; ITO, I. Y. Microbial contamination of toothbrushes and their decontamination. **Pediatr Dent**, 22:381-4, 2000.

NELSON-FILHO, P.; Faria, G.; DA SILVA, R. A.; ROSSI, M. A.; ITO, I. Y. Evaluation of the contamination and disinfection methods of toothbrushes used by 24- to 48-month-old children. **J Dent Child** (Chic). 2006 Sep-Dec;73(3):152-8.

NEVES, L.J.; SÁ, M.F.A. Contribuição ao estudo das plantas medicinais *Mikania glomerata* Spreng. **Ver. Bras. Farm.**, v. 72, n. 2, p. 42-47, 1991.

NEWBRUN E. Preventing dental caries: breaking the chain of transmission. **Am Dent Assoc J** 1992; 123:55-9.

NEWMAN, D. J.; CRAGG, G. M. (2007). Natural products as sources of new drugs over the last 25 years. **Journal of natural products**, 70(3), 461-77. doi:10.1021/np068054v

NGUEYEM, T.A.; BRUSOTTI, G.; MARRUBINI G, GRISOLI P, DACARRO C, VIDARI G, FINZI PV, CACCIALANZA G. Validation of use of a traditional remedy from *Bridelia grandis* (Pierre ex Hutch) stem bark against oral Streptococci. **J Ethnopharmacol**. 2008 Oct 30;120(1):13-6. Epub 2008 Jul 25

OKUYAMA C. E., BITENCOURT J. J. G., OLIVEIRA D. A. F., OLIVEIRA M. S., BARBOSA B.S.S., SAWAYA A. C. H. F., EBERLIN M. N. Evaluation of the antimicrobial and antioxidant activity, and cytotoxicity of extracts of *Mikania laevigata* Schultz bip (Asteraceae). **Revista de Pesquisa e Inovação Farmacêutica**, vol. 3, n. 1, 2011.

OLIVEIRA, F.; ALVARENGA, M.A.; AKISUE, G.; AKISUE, M.K. Isolamento e identificação de componentes químicos de *Mikania glomerata* Sprengel e de *Mikania laevigata* Schultz Bip. ex Baker. **Revista de Farmácia e Bioquímica da Universidade de São Paulo**, v.20, n. 2, p.169-83, Jul./Dez. 1984.

OLIVEIRA, F.; OGA, S.; AKISUE, G.; AKISUE, M.K. Parâmetros físicos e químicos e efeito antiedema dos extratos fluidos de guaco (*Mikania glomerata* Sprengel) e de guaco de mato (*Mikania laevigata* Schultz Bip. ex Baker). **Farm. Quim.**, v. 25, n. 1,2, p. 50-54, 1985.

OLIVEIRA, F.Q.; GOBIRA, B.; GUIMARÃES, C.; BATISTA,J.; BARRETO, M.; SOUZA, M. Espécies vegetais indicadas na odontologia. **Rev. Bras. Farmacognosia**, v. 17, n. 3, p. 466-476, 2007.

PARK, Y. S.; AHN, J. S.; KWON, H. B.; LEE, S. P. (2011). Current status of dental caries diagnosis using cone beam computed tomography. **Imaging science in dentistry**, 41(2), 43-51. doi:10.5624/isd.2011.41.2.43

PAULA, J. S.; LEITE, I. C.; ALMEIDA, A. B.; AMBROSANO, G. M.; PEREIRA, A. C.; MIALHE, F. L. (2012). The influence of oral health conditions, socioeconomic status and home environment factors on schoolchildren's self-perception of quality of life. **Health and quality of life outcomes**, 10(1), 6. doi:10.1186/1477-7525-10-6

PEREIRA, J. B. Atividade antimicrobiana do extrato hidroalcoólico da *Punica granatum* Linn. Sobre microrganismos formadores de placa bacteriana. **Pesquisa Brasileira em Odontopediatria e Clínica Integrada**, 4: 265. 2004.

PEREIRA, J. V.; PEREIRA, M. S. V.; SAMPAIO, F. C.; SAMPAIO, M. C. C.; ALVES, P. M.; ARAÚJO, C. R. F.; HIGINO, J. S. Efeito antibacteriano e antiaderente in vitro do extrato da *Punica granatum* Linn. sobre microrganismos do biofilme dental. **Rev Bras Farmacogn**, 16: 88-93, 2006.

PINTO, E. D. R.; PAIVA, E. M. M.; PIMENTA, F. C. Viabilidade de microrganismos anaeróbios da cavidade bucal em escovas dentárias. **Periodontia**, 6:8-12, 1997.

QUIRYNEN, M.; SOETE, M. de; PAUWELS, M.; GIZANI, S.; MEERBEEK, B. van; STEENBERGHE, D. van. Can toothpaste or a toothbrush with antibacterial tufts prevent toothbrush contamination? **J Periodontol**, 74:312-22, 2003.

QUIRYNEN, M.; SOETE, M. de; PAUWELS, M.; GOOSSENS, K.; TEUGHEL, W.; van ELDERE J.; STEENBERGHE, D. van. Bacterial survival rate on tooth and interdental brushes in relation to the use of toothpaste. **J Clin Periodontol**, 28:1106-14, 2001.

REHDER, V. L. G.; RODRÍGUES, M. V. N.; SARTORATTO, A.; SANTOS, A. S.; FIGUEIRA, G. M. Avaliação da composição química dos óleos essenciais de *Mikania laevigata* Schultz Bip e *Mikania glomerata* Sprengel. In: **Simpósio de Plantas Medicinais do Brasil**, XVI (2000) Recife, PE, Brasil, Livro de Resumos, p. 124-125

RWENYONYI, C. M.; KUTESA, A.; MUWAZI, L.; OKULLO, I.; KASANNGAKI, A.; KEKITINWA, A. (2011). Oral Manifestations in HIV/AIDS-Infected Children. **European journal of dentistry**, 5(3), 291-8.

RITTER, M. R.; BAPTISTA, L. R. M.; MATZENBACHER, N. I. Asteraceae. Gênero *Mikania* Willd. Seções *Globosae* e *Thyrsigerae*. Flora Ilustrada do Rio Grande do Sul, n. 21. **Boletim do Instituto de Biociências**, UFRGS. Porto Alegre, n. 50, p. 1-90, 1992.

SÁ, R. C. S.; LEITE, M. N.; PETERS, M. V. et al. Absence of mutagenic effect of *Mikania glomerata* hidroalcoholic extract on adult Wistar rats in vivo. **Brazilian Archives of Biology and Technology**. v. 49, n. 4, p. 599-604, jul 2006.

SÁ, R. C. S.; LEITE, M. N.; REPOREDO, M. M.; ALMEIDA, R. N. Evaluation of long-term exposure to *Mikania glomerata* (Sprengel) extract on male Wistar rats' reproductive organs, sperm production and testosterone level. **Contraception**, v. 67, n. 4, p. 327-331, 2003.

SÁ, R. C. S.; LEITE, M. N.; ALMEIDA, R. N. "Toxicological screening of *Mikania glomerata* Spreng., Asteraceae, extract in male Wistar rats reproductive system, sperm production and testosterone level after chronic treatment." **Revista Brasileira de Farmacognosia** v., 20, n. 5p. 718-728.2010.

SALES-PERES, S. H. D. C. (n.d.). Manifestações orais em crianças HIV, em Moçambique. **Ciênc. saúde coletiva** vol.17 n.1 p. 55-60 Jan. 2012

SANCHES, M. H.; Peres, S. H. C. S.; Peres, A. S.; Bastos, J. R. M. Descontaminação das escovas dentais por imersão em soluções anti-sépticas. **RGO**, 49:167-71, 2001.

SANTOS, T. C.; TOMASSINI, T. C. B.; CABRAL, L. M. Estudos preliminares sobre a constituição química e atividade antimicrobiana de *Mikania glomerata* Sprengel. **Rev. Bras. Farm.**, v. 79, n. 3,4, p. 54-55, 1998.

SATO, S.; ITO, Y. I.; LARA, E. H. G.; PANZERI, H.; Albuquerque Júnior, R. F.; Pedrazzi, V. Bacterial survival rate on toothbrushes and their decontamination with antimicrobial solutions. **J Appl Oral Sci**, 12:1-9, 2004.

SILVEIRA, C. S.; SEMAAN, F. S.; MACIEL, E. V.; CHAVASCO, J. K. Avaliação da eficiência do porta- escovas na prevenção da contaminação de escovas dentais por coliformes fecais e parasitas intestinais. **Rev CROMG**; 8:65-8. 2002.

SOUSA, A. M.; POCHAPSKI, M. T.; SANTOS, F. A.; PILATTI, G. L. Estudo clínico sobre a influência do dentifrício na efetividade da clorexidina no controle do biofilme dental. *R. Periodontia*, v. 19(1):71-75, 2009.

SPOLIDORIO, D. M. P.; GOTO, E.; NEGRINI, T. C.; SPOLIDORIO, L. C. Viability of *Streptococcus mutans* on transparent and opaque toothbrushes. **J Dent Hyg**, 77:114-7, 2003

SVANBERG, M. Contamination of toothpaste and toothbrush by *Streptococcus mutans*. **Scand J Dent Res**, v.86, p. 412-4, 1978.

TAJI, S. S.; ROGERS, A. H. The microbial contamination of toothbrushes. A pilot study. **Aust Dent J** , v. 43, p.:128-30, 1998.

VAN HOUTE, J. Role of microorganisms in caries etiology. **J Dent Res**, v. 73, n. 3, p. 672-681,1994.

WHITLEY, R.; GILMORE, E. Contaminated toothbrushes and their disinfection. **J Dent Res**, 52(Special Issue):218. 1973.

WHO. World Health Organization. Traditional Medicine Strategy 2002 - 2005. Geneva: World Health Organization, 2002. 74 p.

YATSUDA, R.; ROSALEN, P. L.; CURY, J. A.; MURATA, R. M.; REHDER, V. L. G.; MELO, L. V. KOO, H. Effects of *Mikania* genus on growth and cell adherence of *mutans streptococci*. **J. Ethnopharmacol.**, v. 97, p. 183-189, 2005.

UNES, R. N.; VARELLA, A. D.; SUFFREDINI, I. B. Discovery of new antitumoral and antibacterial drugs from brazilian plant extracts using high throughput screening. **Clinics**, 62, p.763-768, 2007.

ZOLNOWSKI-CASEY, M. An infection control procedure that is the patient's responsibility. **J Am Dent Assoc**, 129:616-7, 1998.

## APÊNDICES

APÊNDICE A - Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

**TERMO DE CONSENTIMENTO**

Vitória, \_\_\_\_ de \_\_\_\_\_ de 2011.

Eu, \_\_\_\_\_  
Diretor (a) da Escola São Domingos, com CPF \_\_\_\_\_ autorizo os alunos matriculados nesta entidade a participar da pesquisa intitulada “Atividade antibacteriana da *Mikania glomerata* e *Mikania laevigata* em crianças em idade pré-escolar na desinfecção de escovas dentais”, conduzida pela Profa. Dra. Fernanda Campos Rosetti Lessa e a mestranda Claudia Helena Bermudes Grillo, cirurgiãs-dentistas.

O propósito do estudo será avaliar a efetividade de dois novos antimicrobianos para desinfecção de escovas dentais.

Estou ciente de que esta pesquisa é científica e poderá ser publicada em jornais, revistas e/ou congressos científicos no país e no exterior, mantendo-se o sigilo e respeitando-se o código de Defesa do Menor e do Adolescente.

Declaro que fui devidamente esclarecido (de forma oral e por escrito) que:

- O material obtido será utilizado para uma pesquisa na área odontológica/farmacêutica, onde serão avaliados métodos para reduzir a microbiota bucal;
- Este procedimento não irá causar nenhum prejuízo à integridade física ou moral da criança, e não causará desconforto ou risco;
- Após o término da pesquisa, cada criança receberá uma escova dental nova e um tubo de pasta de dente fluoretada, e será ministrada brincadeira educativa, sobre prevenção da cárie dental;
- Tenho plena liberdade de recusar que o menor sob minha responsabilidade participe desta pesquisa, assim como tenho liberdade de retirá-lo desta pesquisa a qualquer momento, sem nenhuma penalização ou prejuízo;
- Os pesquisadores se comprometem a prestar assistência, caso ocorra algum problema relacionado à execução da parte clínica do projeto (Rua: Comissário José Dantas de Melo, 21, Boa Vista, telefone: 27 81213636).
- Não é previsto o ressarcimento de despesas ou indenização, já que a conduta da coleta das escovas dentais não é agressiva à saúde física ou moral;
- Estou ciente de que esta pesquisa tem como responsáveis as Profas.Dras. Fernanda Campos Rosetti Lessa e Denise Coutinho Endringer e a mestranda Claudia Helena Bermudes Grillo.

Assino este documento de livre e espontânea vontade, estando ciente do seu conteúdo.

\_\_\_\_\_  
**Assinatura do Diretor (a)**

RG: \_\_\_\_\_

CPF \_\_\_\_\_

***Profa Dra Fernanda Campos Rosetti Lessa***

***Profa Dra Denise Coutinho Endringer***

***Mestranda Claudia Helena Bermudes Grillo***



## APÊNDICE B - Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

### TERMO DE CONSENTIMENTO

Nome da criança: \_\_\_\_\_

Por este instrumento de autorização, na qualidade de \_\_\_\_\_ autorizo que o menor \_\_\_\_\_ participe do estudo: "Atividade antibacteriana da *Mikania glomerata* e *Mikania laevigata* em crianças em idade pré-escolar na desinfecção de escovas dentais", conduzida pela Profa. Dra. Fernanda Campos Rosetti Lessa e a mestranda Claudia Helena Bermudes Grillo, cirurgiãs-dentistas.

O propósito do estudo será avaliar a efetividade de dois novos antimicrobianos para desinfecção de escovas dentais.

Estou ciente de que esta pesquisa é científica e poderá ser publicada em jornais, revistas e/ou congressos científicos no país e no exterior, mantendo-se o sigilo e respeitando-se o código de Defesa do Menor e do Adolescente.

Declaro que fui devidamente esclarecido (de forma oral e por escrito) que:

- O material obtido será utilizado para uma pesquisa na área odontológica/farmacêutica, onde serão avaliados métodos para reduzir a microbiota bucal;
- **Este procedimento não irá causar nenhum prejuízo à integridade física ou moral da criança, e não causará desconforto ou risco;**
- Após o término da pesquisa, cada criança receberá uma escova dental nova e um tubo de creme dental sem flúor, e será ministrada brincadeira educativa, sobre prevenção da cárie dental;
- Tenho plena liberdade de recusar que o menor sob minha responsabilidade participe desta pesquisa, assim como tenho liberdade de retirá-lo desta pesquisa a qualquer momento, sem nenhuma penalização ou prejuízo;
- Os pesquisadores se comprometem a prestar assistência, caso ocorra algum problema relacionado à execução da parte clínica do projeto (Rua: Comissário José Dantas de Melo, 21, Boa Vista, telefone: 27 81213636)
- Não é previsto o ressarcimento de despesas ou indenização, já que a conduta da coleta das escovas dentais não é agressiva à saúde física ou moral;
- Estou ciente de que esta pesquisa tem como responsáveis as Profs.Drs. Fernanda Campos Rosetti Lessa, Denise Coutinho Endringer e a mestranda Claudia Helena Bermudes Grillo.

Assino este documento de livre e espontânea vontade, estando ciente do seu conteúdo.

Vitória, \_\_\_\_\_ de \_\_\_\_\_ de 20\_\_.

\_\_\_\_\_  
**Assinatura do pai/mãe/responsável**

**Profa Dra Fernanda Campos Rosetti Lessa**

**Profa Dra Denise Coutinho Endringer**

**Mestranda Claudia Helena Bermudes Grillo**

## ANEXOS

## ANEXO A - Normas da Revista

# COPYRIGHT TRANSFER AGREEMENT



Date: \_\_\_\_\_ Contributor name: \_\_\_\_\_

Contributor address: \_\_\_\_\_

Manuscript number (if known): \_\_\_\_\_

Re: Manuscript entitled \_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_ (the "Contribution")

for publication in \_\_\_\_\_ (the "Journal")

published by \_\_\_\_\_ ("Wiley-Blackwell").

Dear Contributor(s):

Thank you for submitting your Contribution for publication. In order to expedite the editing and publishing process and enable Wiley-Blackwell to disseminate your Contribution to the fullest extent, we need to have this Copyright Transfer Agreement signed and returned as directed in the Journal's instructions for authors as soon as possible. If the Contribution is not accepted for publication, or if the Contribution is subsequently rejected, this Agreement shall be null and void. **Publication cannot proceed without a signed copy of this Agreement.**

## A. COPYRIGHT

1. The Contributor assigns to Wiley-Blackwell, during the full term of copyright and any extensions or renewals, all copyright in and to the Contribution, and all rights therein, including but not limited to the right to publish, republish, transmit, sell, distribute and otherwise use the Contribution in whole or in part in electronic and print editions of the Journal and in derivative works throughout the world, in all languages and in all media of expression now known or later developed, and to license or permit others to do so.

2. Reproduction, posting, transmission or other distribution or use of the final Contribution in whole or in part in any medium by the Contributor as permitted by this Agreement requires a citation to the Journal and an appropriate credit to Wiley-Blackwell as Publisher, and/or the Society if applicable, suitable in form and content as follows: (Title of Article, Author, Journal Title and Volume/Issue, Copyright © [year], copyright owner as specified in the Journal). Links to the final article on Wiley-Blackwell's website are encouraged where appropriate.

## B. RETAINED RIGHTS

Notwithstanding the above, the Contributor or, if applicable, the Contributor's Employer, retains all proprietary rights other than copyright, such as patent rights, in any process, procedure or article of manufacture described in the Contribution.

## C. PERMITTED USES BY CONTRIBUTOR

1. **Submitted Version.** Wiley-Blackwell licenses back the following rights to the Contributor in the version of the Contribution as originally submitted for publication:

a. After publication of the final article, the right to self-archive on the Contributor's personal website or in the Contributor's institution's/employer's institutional repository or archive. This right extends to both intranets and the Internet. The Contributor may not update the submission version or replace it with the published Contribution. The version posted must contain a legend as follows: This is the pre-peer reviewed version of the following article: FULL CITE, which has been published in final form at [Link to final article].

b. The right to transmit, print and share copies with colleagues.

2. **Accepted Version.** Re-use of the accepted and peer-reviewed (but not final) version of the Contribution shall be by separate agreement with Wiley-Blackwell. Wiley-Blackwell has agreements with certain funding agencies governing reuse of this version. The details of those relationships, and other offerings allowing open web use, are set forth at the following website: <http://www.wiley.com/go/funderstatement>. NIH grantees should check the box at the bottom of this document.

3. **Final Published Version.** Wiley-Blackwell hereby licenses back to the Contributor the following rights with respect to the final published version of the Contribution:

a. Copies for colleagues. The personal right of the Contributor only to send or transmit individual copies of the final published version in any format to colleagues upon their specific request provided no fee is charged, and further-provided that there is no systematic distribution of the Contribution, e.g. posting on a listserve, website or automated delivery.

b. Re-use in other publications. The right to re-use the final Contribution or parts thereof for any publication authored or edited by the Contributor (excluding journal articles) where such re-used material constitutes less than half of the total material in such publication. In such case, any modifications should be accurately noted.

c. Teaching duties. The right to include the Contribution in teaching or training duties at the Contributor's institution/place of employment including in course packs, e-reserves, presentation at professional conferences, in-house training, or distance learning. The Contribution may not be used in seminars outside of normal teaching obligations (e.g. commercial seminars). Electronic posting of the final published version in connection with teaching/training at the Contributor's institution/place of employment is permitted subject to the implementation of reasonable access control mechanisms, such as user name and password. Posting the final published version on the open Internet is not permitted.

d. Oral presentations. The right to make oral presentations based on the Contribution.

4. **Article Abstracts, Figures, Tables, Data Sets, Artwork and Selected Text (up to 250 words).**

a. Contributors may re-use unmodified abstracts for any non-commercial purpose. For on-line uses of the abstracts, Wiley-Blackwell encourages but does not require linking back to the final published versions.

b. Contributors may re-use figures, tables, data sets, artwork, and selected text up to 250 words from their Contributions, provided the following conditions are met:

(i) Full and accurate credit must be given to the Contribution.

(ii) Modifications to the figures, tables and data must be noted. Otherwise, no changes may be made.

(iii) The reuse may not be made for direct commercial purposes, or for financial consideration to the Contributor.

(iv) Nothing herein shall permit dual publication in violation of journal ethical practices.

#### D. CONTRIBUTIONS OWNED BY EMPLOYER

1. If the Contribution was written by the Contributor in the course of the Contributor's employment (as a "work-made-for-hire" in the course of employment), the Contribution is owned by the company/employer which must sign this Agreement (in addition to the Contributor's signature) in the space provided below. In such case, the company/employer hereby assigns to Wiley-Blackwell, during the full term of copyright, all copyright in and to the Contribution for the full term of copyright throughout the world as specified in paragraph A above.

2. In addition to the rights specified as retained in paragraph B above and the rights granted back to the Contributor pursuant to paragraph C above, Wiley-Blackwell hereby grants back, without charge, to such company/employer, its subsidiaries and divisions, the right to make copies of and distribute the final published Contribution internally in print format or electronically on the Company's internal network. Copies so used may not be resold or distributed externally. However the company/employer may include information and text from the Contribution as part of an information package included with software or other products offered for sale or license or included in patent applications. Posting of the final published Contribution by the institution on a public access website may only be done with Wiley-Blackwell's written permission, and payment of any applicable fee(s). Also, upon payment of Wiley-Blackwell's reprint fee, the institution may distribute print copies of the published Contribution externally.

#### E. GOVERNMENT CONTRACTS

In the case of a Contribution prepared under U.S. Government contract or grant, the U.S. Government may reproduce, without charge, all or portions of the Contribution and may authorize others to do so, for official U.S. Govern-

ment purposes only, if the U.S. Government contract or grant so requires. (U.S. Government, U.K. Government, and other government employees: see notes at end)

#### F. COPYRIGHT NOTICE

The Contributor and the company/employer agree that any and all copies of the final published version of the Contribution or any part thereof distributed or posted by them in print or electronic format as permitted herein will include the notice of copyright as stipulated in the Journal and a full citation to the Journal as published by Wiley-Blackwell.

#### G. CONTRIBUTOR'S REPRESENTATIONS

The Contributor represents that the Contribution is the Contributor's original work, all individuals identified as Contributors actually contributed to the Contribution, and all individuals who contributed are included. If the Contribution was prepared jointly, the Contributor agrees to inform the co-Contributors of the terms of this Agreement and to obtain their signature to this Agreement or their written permission to sign on their behalf. The Contribution is submitted only to this Journal and has not been published before. (If excerpts from copyrighted works owned by third parties are included, the Contributor will obtain written permission from the copyright owners for all uses as set forth in Wiley-Blackwell's permissions form or in the Journal's Instructions for Contributors, and show credit to the sources in the Contribution.) The Contributor also warrants that the Contribution contains no libelous or unlawful statements, does not infringe upon the rights (including without limitation the copyright, patent or trademark rights) or the privacy of others, or contain material or instructions that might cause harm or injury.

---

#### CHECK ONE BOX:

<input type="checkbox"/> Contributor-owned work		
<b>ATTACH ADDITIONAL SIGNATURE PAGES AS NECESSARY</b>	Contributor's signature _____	Date _____
	Type or print name and title _____	
	Co-contributor's signature _____	Date _____
	Type or print name and title _____	
<input type="checkbox"/> Company/Institution-owned work (made-for-hire in the course of employment)	Company or Institution (Employer-for-Hire) _____	Date _____
	Authorized signature of Employer _____	Date _____
<input type="checkbox"/> U.S. Government work	<b>Note to U.S. Government Employees</b> A contribution prepared by a U.S. federal government employee as part of the employee's official duties, or which is an official U.S. Government publication, is called a "U.S. Government work," and is in the public domain in the United States. In such case, the employee may cross out Paragraph A.1 but must sign (in the Contributor's signature line) and return this Agreement. If the Contribution was not prepared as part of the employee's duties or is not an official U.S. Government publication, it is not a U.S. Government work.	
<input type="checkbox"/> U.K. Government work (Crown Copyright)	<b>Note to U.K. Government Employees</b> The rights in a Contribution prepared by an employee of a U.K. government department, agency or other Crown body as part of his/her official duties, or which is an official government publication, belong to the Crown. U.K. government authors should submit a signed declaration form together with this Agreement. The form can be obtained via <a href="http://www.opsi.gov.uk/advice/crown-copyright/copyright-guidance/publication-of-articles-written-by-ministers-and-civil-servants.htm">http://www.opsi.gov.uk/advice/crown-copyright/copyright-guidance/publication-of-articles-written-by-ministers-and-civil-servants.htm</a>	
<input type="checkbox"/> Other Government work	<b>Note to Non-U.S., Non-U.K. Government Employees</b> If your status as a government employee legally prevents you from signing this Agreement, please contact the editorial office.	
<input type="checkbox"/> NIH Grantees	<b>Note to NIH Grantees</b> Pursuant to NIH mandate, Wiley-Blackwell will post the accepted version of Contributions authored by NIH grant-holders to PubMed Central upon acceptance. This accepted version will be made publicly available 12 months after publication. For further information, see <a href="http://www.wiley.com/go/nihmandate">www.wiley.com/go/nihmandate</a> .	

ANEXO B - Cópia do CEP



**CENTRO UNIVERSITÁRIO VILA VELHA  
COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA**

Vila Velha, 10 de fevereiro de 2012.


Da: Prof<sup>ª</sup>. M.Sc. Wanêssa Lacerda Poton  
Coordenadora  
Comitê de Ética em Pesquisa do Centro Universitário Vila Velha – CEP/UVV

Para: Denise Coutinho Endringer  
Pesquisador (a) Responsável pelo Projeto de Pesquisa intitulado:  
Avaliação da atividade antibacteriana da Mikania glomerata e Mikania laevigata em crianças na idade pré-escolar, utilizada na desinfecção de escovas dentais: estudo clinico duplo-cego randomizado.

Senhor(a) pesquisador(a)

Informamos à Vossa Senhoria, que o Comitê de Ética em Pesquisa do Centro Universitário Vila Velha, após analisar o Projeto de Pesquisa, de Registro no CEP-UVV N° 193/2009, intitulado: Avaliação da atividade antibacteriana da Mikania glomerata e Mikania laevigata em crianças na idade pré-escolar, utilizada na desinfecção de escovas dentais: estudo clinico duplo-cego randomizado., bem como o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido cumprindo os procedimentos internos da instituição onde o projeto será realizado, bem como as exigências da Resolução N° 196 de 10/10/96 e demais Resoluções da CONEP, **APROVOU** o referido projeto, em Reunião Ordinária realizada em 11/11/2009.

Gostaríamos de lembrar que cabe ao pesquisador elaborar e apresentar os relatórios parciais e finais de acordo com a resolução do Conselho Nacional de Saúde n° 196 de 10/10/96, inciso IX.2. letra "c"

  
**Prof<sup>ª</sup>. M.Sc. Wanêssa Lacerda Poton**  
Coordenadora do CEP/UVV