

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ODONTOLOGIA
MESTRADO EM ODONTOLOGIA**

**AVALIAÇÃO *in vitro* DA CITOXICIDADE E GENOTOXICIDADE
DE UMA FORMULAÇÃO EM ORABASE DE *Libidibia ferrea* L.**

KEILY DA SILVA MELO

Manaus-AM
2019

**AVALIAÇÃO *in vitro* DA CITOTOXICIDADE E GENOTOXICIDADE
DE UMA FORMULAÇÃO EM ORABASE DE *Libidibia ferrea* L.**

KEILY DA SILVA MELO

Dissertação apresentado ao Programa
de Pós-Graduação em Odontologia da
Universidade Federal do Amazonas
como requisito para obtenção do título
de Mestre em Odontologia.

Orientadora: Prof. Dra. Nikeila Chacon de Oliveira Conde
Co-orientadora: Prof^a Dr^a Carina Toda

Manaus-AM
2019

KEILY DA SILVA MELO

**AVALIAÇÃO *in vitro* DA CITOTOXICIDADE E GENOTOXICIDADE DE UMA
FORMULAÇÃO EM ORABASE DE *Libidibia ferrea* L.**

Dissertação apresentado ao Programa
de Pós-Graduação em Odontologia da
Universidade Federal do Amazonas
como requisito para obtenção do título
de Mestre em Odontologia.

BANCA EXAMINADORA

Profa. Dra. Nikeila Chacon De Oliveira Conde
Orientadora

Profa. Dra. Marne Carvalho de Vasconcellos
Membro

Profa. Dra. Ana Regina Casaroto Moreschi
Membro

Dedicatória

À minha querida mãe Celina Melo,
meu maior modelo e inspiração,
minhas vitórias são sempre nossas,
Amo-te para sempre.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente a Deus pelo dom da vida, por todas as graças recebidas, e principalmente pelas oportunidades que me permitiu aproveitar.

À minha família, em especial a meus pais Francisco e Celina que me ajudaram durante todo o processo, me dando apoio moral, emocional e com certeza sem eles não conseguiria ir tão longe nessa caminhada.

Ao meu noivo Renato que entendeu minhas ausências, me deu apoio emocional sempre me incentivando a correr atrás de meus objetivos.

À minha orientadora profa. Dra. Nikeila Conde por sua incrível paciência e bondade, por ter me acolhido de maneira tão nobre quando ninguém mais o quis fazer, serei eternamente grata por todo o apoio, e pela orientação. Sempre lembrarei de você como exemplo de mestre, mulher, carinho e paciência. Espero poder ser tão competente e amável com meus alunos como você foi comigo, nossos momentos juntas estarão para sempre guardados em meu coração.

À minha co-orientadora Profa. Dra. Carina Toda por todo apoio e troca de conhecimento.

A todos os amigos que fiz ao longo desse mestrado, de modo especial a minha amiga Luciana Aleixo pelo apoio e amizade, sei que esse presente vou levar para o resto da vida.

À coordenação e todos os professores do Programa de Pós-graduação (PPGo) da Universidade Federal do Amazonas- UFAM, pela nova oportunidade e pela possibilidade de retorno a minha casa de graduação, por todo o acolhimento e conhecimento partilhados. Bem como a todos alunos e funcionários com quem pude compartilhar bons momentos todos os dias.

Agradeço por fim a todos que direta ou indiretamente ajudaram ao longo dessa caminhada.

RESUMO

A estomatite aftosa se apresenta como uma das patologias inflamatórias mais comuns da cavidade bucal. As lesões são tratadas de forma sintomática, muitas vezes, através da administração de medicamentos tópicos. Alternativas terapêuticas a base de fitoterápicos tem sido estudadas, sobretudo no que tange a sua segurança de uso, avaliando sua biocompatibilidade, efeito citotóxico e genotóxico. Amplamente encontrado no norte e nordeste brasileiro, o jucá (*Libidibia ferrea*) é popularmente conhecido por suas propriedades medicinais como atividades anti-fúngica, anti-inflamatória e cicatrizante. O presente trabalho teve como objetivo avaliar o efeito citotóxico e genotóxico de uma pomada fitoterápica a base de extrato da casca do caule da *L. ferrea* L. a 2%. A biocompatibilidade da pomada foi avaliada a partir de testes em cultura de células com fibroblastos humanos MRC5, cujas amostras foram solubilizadas em DMSO para preparo da solução estoque e separadas em concentrações teste de 25, 50 e 100 µg/mL, tendo a doxorrubicina como controle positivo e DMSO como controle negativo. O teste de Alamar blue avaliou a citotoxicidade; ensaio de exclusão de azul de tripan avaliou a viabilidade celular; e a coloração diferencial por Hematoxilina e Eosina avaliou a morfologia celular. A genotoxicidade foi avaliada através do ensaio do cometa em pH alcalino e neutro. Os resultados dos testes foram tabulados e analisados estatisticamente, através da estatística descritiva e inferencial, utilizando o Teste ANOVA ($p \leq 0,05$). Diante dos resultados, não se observou atividade citotóxica ou alterações morfológicas que induzissem morte celular para a formulação teste. Quando avaliada a genotoxicidade, a formulação a base de Jucá não foi capaz de induzir dano ao DNA em MRC-5 nas concentrações de 25 e 50 µg/mL tanto em cometa de pH neutro ou alcalino. No ensaio em pH alcalino, o dano mais frequente observado foi em grau 1, na concentração 100 µg/mL demonstrando que a genotoxicidade foi concentração dependente. Pode-se concluir que a formulação testada é biocompatível, não apresentando efeitos citotóxicos e genotóxicos nas condições testadas, demonstrando viabilidade para futuros testes *in vivo*.

PALAVRAS-CHAVES: Jucá; Cicatrização; Fitoterápico; Úlceras orais.

ABSTRACT

Stomatitis is one of the most common inflammatory pathologies of the oral cavity. Lesions are treated symptomatically, often through the administration of topical medications. Therapeutic alternatives based on herbal medicines have been studied, especially regarding their safety of use, evaluating their biocompatibility, cytotoxic and genotoxic effect. Widely found in northern and northeastern Brazil, jucá (*Libidibia ferrea*) is popularly known for its medicinal properties as anti-fungal, anti-inflammatory and healing activities. The objective of the present work was to evaluate the cytotoxic and genotoxic effect of a 2% *L. ferrea* L. stem bark herbal extract ointment. The biocompatibility of the ointment was evaluated from cell culture tests with human MRC5 fibroblasts, whose samples were solubilized in DMSO for stock solution preparation and separated at 25, 50 and 100 µg / mL test concentrations, with doxorubicin as control. positive and DMSO as negative control. The Alamar blue test evaluated cytotoxicity; Trypan blue exclusion assay evaluated cell viability; and hematoxylin and eosin differential staining evaluated cell morphology. Genotoxicity was evaluated by the comet assay at alkaline and neutral pH. The test results were tabulated and statistically analyzed using descriptive and inferential statistics using the ANOVA Test ($p \leq 0.05$). Given the results, there was no cytotoxic activity or morphological changes that induced cell death for the test formulation. When genotoxicity was evaluated, the Jucá-based formulation was unable to induce DNA damage in MRC-5 at 25 and 50 µg / mL concentrations in either a neutral or alkaline pH comet. In the alkaline pH assay, the most frequent damage observed was grade 1, at 100 µg / mL, demonstrating that genotoxicity was concentration dependent. It can be concluded that the tested formulation is biocompatible, showing no cytotoxic and genotoxic effects under the tested conditions, demonstrating viability for future in vivo tests.

KEYWORDS: Jucá; Healing; Phytotherapy; Oral ulcers.

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 - Representação esquemática do desenho de estudo	30
FIGURA 2 - Árvore de <i>Libidibia ferrea</i>	31
FIGURA 3 - Obtenção de matéria prima triturada	31
FIGURA 4 - Preparação do extrato	32
FIGURA 5 - Obtenção do extrato de <i>Libidibia ferrea</i> à seco	33
FIGURA 6 - Rendimento do extrato à seco a 7,5%	33
FIGURA 7 - Componentes da pomada	34
FIGURA 8 - Aquecimento em banho maria até atingir 60°C	35
FIGURA 9 - Manipulação e aspecto final da pomada	35
FIGURA 10 - Cultivo de células em fluxo laminar	36
FIGURA 11 - Tratamento com as soluções teste	37
FIGURA 12 - Adição de Alamar Blue aos poços da placa	38
FIGURA 13 - Leitura em leitor multiplaca	38
FIGURA 14 - Ensaio de azul de tripan	39
FIGURA 15 - Aplicação e leitura de azul de tripan	40
FIGURA 16 - Tratamento com soluções teste e identificação	40
FIGURA 17 - Centrifugação e coloração com H.E	41
FIGURA 18 - Lâmina sendo tratadas com agarose	42
FIGURA 19 - Lâmina em solução de lise	43
FIGURA 20 - Contagem de células viáveis e inviáveis na câmara de Neubauer	46
FIGURA 21 - Efeito das substâncias teste analisadas em microscópio óptico após 72 h em contato com as diluições da pomada em orabase de jucá.	48
FIGURA 22 - Células do controle positivo tratado com doxorubicina apresentando degradação na membrana citoplasmática e alterações nucleares.	49
FIGURA 23 - Efeito do tratamento da Formulação em orabase de <i>Libidibia ferrea</i> L. (Jucá) em fibroblastos na fragmentação do DNA pelo ensaio do cometa em pH alcalino	50
FIGURA 24 - Fotomicrografias do efeito do tratamento da formulação em orabase de <i>Libidibia ferrea</i> L. (jucá) em pH alcalino	50
FIGURA 25 - Efeito do tratamento da Formulação em orabase de <i>Libidibia ferrea</i> L. (Jucá) em fibroblastos na fragmentação do DNA pelo ensaio do cometa em pH neutro	52
FIGURA 26 - Fotomicrografias do efeito do tratamento da formulação em orabase de <i>Libidibia ferrea</i> L. (jucá) em pH neutro	52

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1 - Efeito citotóxico da pomada contendo jucá na linhagem celular de fibroblasto humano (MRC-5) utilizando o ensaio Alamar blue, no tempo de tratamento de 72h.	45
Gráfico 2 - Viabilidade de células MRC-5 após o tratamento com a pomada orabase de <i>Libidibea ferrea</i> L. no tempo de 72h. DX- Doxorrobicina (10 µg/mL).tratamento de 72h	47
Gráfico 3 - Índice de dano do tratamento do Formulação em orabase de <i>Libidibia ferrea</i> L. (Jucá) em fibroblastos em ensaio de cometa alcalino	51
Gráfico 4 - CN: Gráfico de frequência de dano em ensaio de cometa alcalino. Controle Negativo DMSO 0,2%; Doxo: Doxorubicina 10 µM. *p< 0,05.	51
Gráfico 5 - Índice de dano do tratamento do Formulação em orabase de <i>Libidibia ferrea</i> L. (Jucá) em fibroblastos.	53
Gráfico 6 - Cometa Neutro : Controle Negativo DMSO 0,2%; Doxo: Doxorubicina 10 µM. * p< 0,05.	53

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 :Componentes da pomada em orabase	34
Tabelas 2 e 3: Porcentagem de viabilidade celular nas duas exposições ao corante	46
Tabela 4 : Classificação de danos ao DNA	49

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

et al.: e outros (abrev. de “et ali”).

L. Ferrea L.: *Libidibia ferrea* Linné

pH: potencial hidrogeniônico.

ANVISA: Agência Nacional de Vigilância Sanitária

INPA: Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia

UFAM: Universidade Federal do Amazonas

FCF: Faculdade de Ciências Farmacêuticas.

°C: graus celsius

%: porcentagem

CMC: caboximetilcelulose.

mg: miligramas

g: gramas

Kg: Kilogramas

μL: microlitros

μm: micromêtro

Mm: milímetros

q.s.p.: quantidade suficiente para

EP: extrato puro

RPM: rotação por minuto

OMS: Organização Mundial de Saúde

MPV: Matéria prima vegetal

Nº: número

Res.: Resolução

PNPIC: Política Nacional de Práticas Integrativas e Complementares

AM: Amazonas

RDC: Resolução da Diretoria Colegiada

ANOVA: Análise de variância

SUMÁRIO

1.INTRODUÇÃO	13
2.REVISÃO DE LITERATURA	16
2.1 Cavidade bucal	16
2.1.1 Fisiologia bucal	16
2.1.2 Microbiota bucal	16
2.2 Úlceras aftosas	18
2.2.1 Etiologia e patogênese	18
2.2.2 Tratamento	20
2.3 Plantas medicinais e fitoterapia	23
2.3.1 <i>Libidibia ferrea</i> L.	24
2.4 Estudos de citotoxicidade celular	26
2.5 Genotoxicidade	29
3.OBJETIVOS	31
4.MATERIAIS E MÉTODOS	32
4.1 Desenho do estudo	32
4.2 Coleta do material vegetal	33
4.3 Obtenção do extrato	34
4.4 Rendimento do extrato à seco	36
4.5 Preparo da pomada orabase	36
4.6 Teste em cultura de células	38
4.6.1 Solubilização da substância teste	39
4.6.2 Testes de citotoxicidade	39
4.6.2.1 Alamar blue	39
4.6.2.2 Azul de tripan	41
4.6.2.3 Hematoxilina e Eosina	42
4.6.3 Teste de genotoxicidade	44
4.6.3.1 Teste do cometa em pH Alcalino e Neutro	44
4.7 Análise dos Dados	46
5.RESULTADOS	47
5.1 Citotoxicidade por Alamar blue	47
5.2 Viabilidade celular por exclusão do corante azul de tripan	48
5.3 Análise por H.E	50
5.4 Avaliação da genotoxicidade in vitro	51
6.DISSCUSSÃO	56
7.CONCLUSÃO	60
8.REFERÊNCIAS	61

1. INTRODUÇÃO

A estomatite aftosa se apresenta como uma das patologias mais comuns da mucosa oral. Relata-se que a sua prevalência na população em geral varia de 5% a 66% e suas hipóteses patogênicas são numerosas e variadas para diferentes pacientes (NEVILLE *et al.*, 2016).

Surgem quase que exclusivamente em mucosa não queratinizada e a presença de uma mácula eritematosa associadas a sintomas prodrômicos como queimação, prurido ou pontadas estão comumente presentes. As regiões mais afetadas são as mucosas jugal e labial, seguidas pela superfície ventral da língua, fundo de vestibulo, soalho de boca e palato mole (Neville *et al.*, 2016).

A presença de descontinuidade da mucosa, ocasionada por um possível trauma somado a presença de alguns microrganismos presentes no biofilme bucal, levam a um aumento de virulência bacteriana que poderão ser progenitores do desenvolvimento da infecção (CURTIS *et al.*, 2005). Atualmente, o tratamento das úlceras aftosas é baseado em terapias com anestésicos ou produtos bioadesivos protetores, medicamentos tópicos periódicos que reduzem a frequência ou intensidade dos ataques. Lesões isoladas são tratadas comumente com acetonido de triancinolona ou cobertas com gel de clobetasol 0,05%. Em casos mais resistentes lança-se mão de corticóides sistêmicos como xarope de prednisolona ou betametasona, com a orientação de bochechar e depois deglutir, desta forma as úlceras receberam tratamento tópico e sistêmico (ALTENBURG *et al.*, 2014)

É de conhecimento popular que desde os tempos antigos o homem busca na natureza subsídios para melhorar sua condição de vida e garantir sua sobrevivência. Gregos, egípcios e outras civilizações já utilizavam plantas para o tratamento de doenças. O tratamento de feridas com o uso de plantas medicinais tem evoluído com o passar do tempo, apoiado pelos resultados de estudos científicos os quais sinalizam de forma promissora o uso de produtos naturais e fitoterápicos como agentes terapêuticos (SOARES *et al.*, 2013).

Baseando-se na legislação sanitária brasileira, o fitoterápico é o medicamento obtido empregando-se exclusivamente matéria prima vegetal. Caracteriza-se pela sua eficácia e riscos de seu uso, bem como pela sua reprodutibilidade e constância de sua qualidade (RDC 138/03).

A aceitação da fitoterapia pela população leva a ótimas perspectivas no mercado de produtos, inclusive com produtos de uso odontológico (AGRA *et al.*, 2007). Na saúde, de forma geral, os produtos naturais têm uma maior procura pelo fato de sua maior atividade terapêutica com baixa toxicidade, se usados de forma correta, possuem maior biocompatibilidade, além de grande acessibilidade pela população.

No bioma Amazônico, existe uma grande biodiversidade de plantas medicinais utilizadas de forma experimental, entretanto com indicações consistentes por séculos de interação cultural. Entre tantas plantas se destacam aquelas utilizadas como anti-inflamatório e antimicrobiano (OLIVEIRA., 2013)

Dentre as espécies Amazônicas, cita-se o Jucá (*Libidibia ferrea* L.) que é uma árvore leguminosa nativa do Brasil, comumente encontrada no norte e nordeste do Brasil. A espécie *Libidibia ferrea* L. pertence à família das leguminosas cesalpiniáceas, é um exemplo de planta de origem amazônica conhecida popularmente como Jucá, jucaína, pau de ferro e birá-obi. Pode-se utilizar casca do seu caule, bem como a semente do seu fruto, quando preparado em decocção utiliza-se para tratamento de feridas e expectorante. O uso da vagem através de decocção combatem asma e tosses convulsivas, combate de diabetes tipo 2, diminuindo sintomas como volume de urina e sede excessiva (Batista *et al.*, 2010).

Popularmente, seu uso tem sido para o tratamento de afecções bronco-pulmonares, diabetes, reumatismo, câncer, distúrbios gastrointestinais, diarreia, inflamação e dor. Pesquisas atestam sua atividade antifúngica, antibacteriana, anti-inflamatória e analgésica. A casca da *Libidibia ferrea* L. tem sido amplamente utilizada no Norte para aplicação da medicina popular, o que desperta seu interesse para estudos científicos. Também se comprova que tem ação cicatrizante, antiúlcera, hemostática, antidiabética, anti-inflamatória, antifúngica, antihelmíntica e antibacteriana (BATISTA *et al.*, 2010).

Entendendo-se a relevância da fitoterapia, novas formulações devem cumprir as etapas de estudos pré-clínicos de forma a definir padrões de uso seguro bem como a dose terapêutica. Essas definições padrões podem ser feitas através de testes de cultura de célula como a citotoxicidade e genotoxicidade. A citotoxicidade é conceituada pelo efeito destrutivo de algum material a célula, e a genotoxicidade pela detecção de danos genéticos tais como quebra de DNA

ou cromossomos, mutações genéticas, e alterações na habilidade de autoreparação do DNA (CARVALHO *et al.*, 2016). Ensaio de citotoxicidade e genotoxicidade *in vitro* são de extrema importância e caracterização inicial da biocompatibilidade de biomateriais onde tenham interesse em sua aplicação clínica (MASSON e LOBELLO, 2016).

Levando em consideração a necessidade de alternativas de tratamento com opções naturais, mais acessíveis, com ação antiinflamatória, antimicrobiana e cicatrizante em um só medicamento este estudo justifica-se como forma de avaliar a segurança e risco da pomada orabase de *Libidibia ferrea* L. através da avaliação da sua capacidade citotóxica e genotóxica em estudos de cultura de células, visualizando seu uso futuro *in vivo* para o tratamento de úlceras aftosas.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Caverna Bucal

2.1.1 Fisiologia bucal

Como é comum em todas as superfícies internas do sistema digestivo, a cavidade bucal é inteiramente revestida por mucosa, composta por uma lâmina epitelial e por uma camada de tecido conjuntivo subjacente onde se encontram várias glândulas (ROSENBAUER *et al.*, 2001).

A mucosa possui um sistema imune complexo e heterogêneo com estrutura especializada para sua função específica em todas as mucosas espalhadas pelo corpo, e possuem papel fundamental contra agentes patogênicos (WRIGHT, 1985). É povoada por bactérias que vivem em comunidades, verdadeiros ecossistemas que superam inclusive o número de células do corpo humano por volta de 10 vezes mais. Microrganismos diversos e numerosos que coexistem com seu hospedeiro, são nocivos apenas se sistema imune estiver comprometido, ou se existir perda de controle no sistema de detecção de células epiteliais que discriminam quais são nocivos ou não. Muitas dessas bactérias comensais proporcionam efeito benéfico para o hospedeiro, impedindo a colonização de patógenos, influenciam no desenvolvimento normal das células e no sistema imune (COSSEAU *et al.*, 2008).

2.1.2 Microbiota bucal

O corpo humano vive em comensalismo com muitos microorganismos e essas relações vêm evoluindo com os milhões de anos que seguiram, até se tornarem dependentes um dos outros. Entre os vários comensais, temos as bactérias e fungos que juntos formam o microbioma humano. Adicionado a isso as comunidades microbianas dentro do corpo respondem a diferentes condições ambientais, o que influencia a composição das espécies e o tamanho da população (AVILA *et al.*, 2009).

A ação do metabolismo microbiano depende do local do corpo que se encontra e eles trabalham diretamente com as necessidades fisiológicas do hospedeiro, que podem variar de produção de vitamina K, ou renovação tecidual. Em sua grande maioria, as bactérias e fungos que colonizam o homem são benéficos para sua saúde, e por alguma razão que nem sempre é bem

esclarecida os mesmos podem gerar patogenicidade. Bactérias comensais que causam doenças estão sempre presentes, porém as comensais benéficas impedem que eles estabeleçam uma relação perigosa, funcionando assim como um ponto de apoio para o sistema imune (AVILA., 2009).

Em relação a complexidade anatômica a própria cavidade oral não hospeda um único tipo específico de microbiota, mas vários ecossistemas com diferentes composições qualitativas e quantitativas, devido a existência de várias superfícies com texturas e retenções diferentes, com características ambientais próprias e por consequência com características peculiares. Portanto, existem diferentes ecossistemas bucais instalados nas superfícies lisas, presente no dorso lingual, na bolsa periodontal, na superfície dental cariada, dentre outros presentes no meio oral (OLIVEIRA.,2010).

As bactérias são as comunidades mais comuns dentre os filos presentes na cavidade oral, apesar da existência de fungos, estima-se a catalogação de mais de 700 filotipos orais comuns. Entre os principais tipos de bactéria isolados da cavidade oral de indivíduos saudáveis, estão *Streptococcus*, *Gemella*, *Eubacterium*, *Selenomonas*, *Veillonella*, *Actinobactéria*, *Proteobacteria*, *Bacterioidetes* e *Fusobacteria* (ZHANG., 2014). Mais especificamente os *Streptococcus* do grupo *mutans*, *lactobacilos*, *Prevotella intermedia*, *Porphyromonas gingivalis*, *Candida albicans* e *Treponema ssp*, cujos números aumentam diante de uma alteração no ambiente (OLIVEIRA.,2010).

Estudos ainda relatam a presença de bactérias alóctones, que são aquelas ocasionais, provindas de outros *habitats* como ar, alimentos e mãos. Porém a permanência definitiva dessas é apenas em caso de desequilíbrio grave da microbiota bucal. Como exemplo de bactérias alóctones pode-se citar também *Enterobacterias* e *Pseudomonas aeruginosa* comumente encontradas em biofilme de pacientes imunossuprimidos (LILJEMARK *et al.*,1997).

Em sua grande maioria, os processos patológicos que afetam a boca estão associados a algum agente infeccioso. Porém, a microbiota residente tem papel importante na resistência inespecífica do hospedeiro frente a patógenos que não são típicos daquele meio. Contudo, também pode influenciar na patogenicidade de muitas condições clínicas como cárie, doenças periodontais, endodônticas e periapicais, bem como lesões ulceradas (FOSCHI *et al.*, 2006).

2.2 Úlceras aftosas

2.2.1 Etiologia e patogênese

Úlceras são caracterizadas como perda de solução de continuidade de um tecido cutâneo ou mucoso, que acarretam alterações de estrutura anatômica ou perda de função fisiológica dos tecidos comprometidos. Na boca caracteriza uma das lesões mais comuns em tecido mole (NEVILLE, 2016).

As lesões ulceradas que mais acometem a mucosa oral, geralmente são a úlcera traumática e a úlcera aftosa recorrente, ambas possuem sinais clínicos e sintomas semelhantes, porém, as causas são diferentes. Na maioria dos casos de ulceração traumática, há uma fonte adjacente de irritação, que pode ser física, química, térmica ou elétrica, a manifestação clínica muitas vezes sugere a etiologia. Os locais mais afetados são língua, lábio, mucosa jugal e estabelecer a relação causa/efeito é a opção mais rápida para eliminar os fatores causais. A estomatite aftosa recorrente por sua vez, pode ser causada por múltiplos fatores como: alergias, predisposição genética, alterações hematológicas, influências hormonais, agentes infecciosos, alterações nutricionais, trauma, estresse (HAMED I *et al.*, 2016).

A etiologia da úlcera aftosa recorrente (UAR) é desconhecida, e clinicamente são divididas em três tipos de acordo com sua cronologia de reparação ou com característica clínica: Maior, menor e herpertiforme. A forma mais comum é a UAR menor, com prevalência de 70% de diâmetro menor que um centímetro, possui margem clara e seu período de restabelecimento é dentro de 10 a 14 dias. A prevalência no tipo maior, é de 7% a 20%, e seu diâmetro é superior a 1 cm, pode ter presença de disfagia, e seu tratamento pode levar semanas. O tipo clínico herpertiforme ocorre de forma causal e pode estar associada a úlceras pequenas e múltiplas, a sua cura pode demorar de 7 a 10 dias. Essas lesões se manifestam em uma variedade de condições que podem ser desde doenças autoimunes até neoplasias malignas, além de processos infecciosos, avitaminoses, alergias, traumas e fatores iatrogênicos (HAMED I *et al.*, 2016).

A classificação do quadro clínico da UAR é feita em 4 estágios de desenvolvimento: Primeiro representado por um aspecto sintomático, caracterizado pelo prurido, algia e rugosidade da mucosa nas primeiras 24 horas. A segunda etapa é a pré-ulcerativa, caracterizada por eritema, mácula localizada

com discreta elevação dos bordos e consistência endurecida, apresentando uma membrana superficial circular, halo eritematoso e dor. O terceiro estágio é o ulcerativo propriamente dito quanto a membrana torna-se esbranquiçada e necrótica, que acontece em um período de até 3 dias. Seguida pela formação de um exudato amarelado na base da lesão, o halo eritematoso permanece, e a lesão assume uma aparência crateriforme. Esse é o auge de seu desenvolvimento, e a sintomatologia dolorosa diminui, tornando-se apenas um desconforto. A fase de reparação acontece espontaneamente (EDGAR *et al.*, 2017).

Já as úlceras traumáticas podem ocorrer devido à alimentos cortantes ou mordidas acidentais durante a mastigação, escovação excessiva, ou mesmo traumas durante o sono. Seu tempo de duração não é certo e podem permanecer por períodos longos, entretanto a maioria se regenera em curto prazo de tempo. Quanto a localização ocorre mais comumente em superfícies não queratinizadas como em mucosa, borda de língua, e lábios, que podem ser facilmente traumatizadas pelos dentes. Porém também podem ser encontradas na gengiva, palato e vestíbulo bucal por outras fontes como traumas por escovação. Normalmente medem cerca de 1 cm e possuem cura espontânea sem presença de cicatriz residual (NEVILLE., 2016).

Quando a mucosa é lesionada inicia-se imediatamente a cicatrização. A reparação tecidual ocorre de forma dinâmica, complexa e independente, composta de várias fases. Se compõe de uma reorganização tecidual e se inicia a partir da perda do tecido, que vai ser substituído por um tecido conjuntivo vascularizado (SOUZA, 2017).

A reação imediata é a primeira fase desse processo, construída por uma resposta inicial ao trauma. Ocorre com uma reação vascular e inflamatória, que induz a hemostasia. Logo após o trauma ocorre a vasoconstrição que encerra o sangramento, esse evento ocorre na presença de muitas células como plaquetas e coágulos de fibrina, ativando assim a cascata de coagulação. Migração de células inflamatórias, seguida da ativação dos mecanismos de proteção e ativação da cicatrização. A inflamação desencadeia sinais clínicos como calor, dor, edema, rubor e perda de função, sinais que podem variar em intensidade, em caso de processo infeccioso ocorre intensificação da inflamação. No quadro infeccioso a presença de corpos estranhos ou restos teciduais necróticos a fase

inflamatória se prolonga, desencadeando destruição tecidual, impedindo a formação de vasos novos, inibindo a síntese de colágeno e impedindo a reepitelização. Logo esses restos teciduais devem ser removidos de forma mecânica ou autolítica, para que o processo reparador tenha continuidade (SOUZA., 2017).

2.2.2 Tratamento

Como a etiologia da doença não é completamente conhecida, muitos medicamentos foram e são ainda avaliados para palição dos sintomas. E consiste em um tratamento multifocal que pode variar de acordo com os fatores predisponentes de cada paciente. De qualquer forma, todos os quadros clínicos são tratados de forma sintomática procurando reduzir a inflamação e principalmente aliviar a dor através da administração de medicamentos tópicos ou sistêmicos (BELENGUER-GUALLAR *et al.*, 2014).

Estudos descrevem diferentes abordagens para o tratamento de aftas, sendo importante a avaliação clínica geral do paciente através exames laboratoriais incluindo nesses contagem de glóbulos vermelhos, ácido fólico, ferritina e vitamina b12 subjacentes como avitaminoses, doenças gastrointestinais, Síndrome de Behçet ou imunodeficiências, com o intuito de descartar possíveis causas sistêmicas, para então o tratamento farmacológico (BELENGUER-GUALLAR *et al.*, 2014).

Em seu estudo, Belenguer-Guallar *et al.* (2014) afirmam que o mais correto seria dividir os pacientes em grupos de acordo com suas características clínicas para assim então proceder com o melhor tratamento. Da seguinte forma, pacientes do tipo A são os que possuem breves episódios que ocorrem esporadicamente durante o ano e tem níveis toleráveis de dor, aconselha-se apenas controlar os fatores predisponentes, por exemplo aconselhar o uso de uma escova mais macia para evitar o trauma durante a escovação, ou ainda verificar os hábitos alimentares dos pacientes afim de associar possíveis surtos com determinados alimentos duros ou ácidos. Paciente do tipo B possuem episódios com intervalos menores, mensalmente na verdade e a dor faz com que o paciente modifique seus hábitos de higiene e sua alimentação, neste tipo de paciente já se indica o uso de pomadas tópicas de corticóide além da remoção de fatores predisponentes. Paciente pertencentes ao grupo C são aqueles que

possuem aftas crônicas com episódios dolorosos, com presença de desenvolvimento de lesões enquanto outras ainda não se curaram, nesses casos o autor indica entrar com um tratamento sistêmico além do tópico.

Aconselha-se que o tratamento medicamentoso inicie com drogas tópicas, e para isso tem-se uma gama de opções, os de primeira linha incluem anti-sépticos e antiinflamatórios com ação analgésica também, exemplos desses são clorexidina em forma de gel ou enxaguantes bucais, com frequência de duas a três vezes ao dia, sem deglutir pelo o tempo em que a lesão persistir, Triclosan, Diclofenaco tópico e Cloridrato de benzidamina produzem efeitos antiinflamatório, anti-séptico e analgésico (BELENGUER-GUALLAR *et al.*, 2014).

Inicialmente os anestésicos tópicos proporcionam alívio de dor satisfatório, neste podemos incluir a Lidocaína em forma de creme a 1%, ou a 2% em forma de gel e spray, Polidocanol como pasta; Enxaguatórios bucais também são eficientes e em sua composição podem ter Benzocaína e Cloreto de Cetilpiridínio (ALTENBURG *et al.*, 2014).

Enxaguatório bucal contendo 0,15% de Triclosan em etanol mais sulfato de zinco reduz a incidência de novas úlceras aftosas em 43% dos casos analisados, diminui a intensidade da dor em 45% e aumenta o intervalo entre as crises de úlceras. Neste grupo também podemos citar Diclofenaco 3% em forma de gel ou ácido hialurônico a 2,5% apresentaram resultados mais satisfatórios que a Lidocaína a 3% reduzindo a dor após 2 ou 6 horas passadas da aplicação. Extrato de camomila e Clorexidina juntos em forma de bochecho, não só reduzem a frequência como também aumentam a velocidade de cicatrização, e diminuem a gravidade das úlceras aftosas. Clorexidina isolada a 0,12% em forma de gel ou spray também se mostrou eficiente. A cauterização da ulcera com solução de peróxido de hidrogênio 0,5% ou solução de nitrato de prata a 1% ou 2% reduz significativamente a intensidade da dor um dia após a aplicação, porém estudos relatam que ele não aumenta a velocidade de cicatrização (ALTENBURG *et al.*, 2014).

O uso de corticóides tópicos pode ocorrer em casos mais graves, nesse grupo pomadas que contenham em sua formulação Prednisona ou Triancinolona aplicada uma a duas vezes ao dia demonstram eficácia. A combinação de anestésicos tópicos e corticóides como a Triancinolona por exemplo em

aplicação noturna apresenta efeitos satisfatórios. Estudos ainda apontam que a Dexametasona em comparação com a triancinolona teve efeito cicatricial mais rápido e eficiente na cicatrização de úlceras aftosas (EDGAR et al., 2017).

Em casos mais graves pode-se ainda lançar mão de terapia de corticóides sistêmicos, seja em monoterapia como a colchicina ou Benztatina, mostram eficácia em sua apresentação, os contratempos encontrados nesse tipo de terapia foram apenas na descontinuidade do uso o que provoca o retorno das crises, ou ainda o aumento da suscetibilidade do paciente à crises fúngicas. Outra forma de tratamento proposto foi a fototerapia dinâmica que combinada a um agente fotossensível como o azul de toluidina comprovou resultados satisfatórios dois dias após a terapia (CASSAMASSIMO., 2018).

A automedicação pode prejudicar o processo de reparação que deveria ocorrer de forma espontânea, o uso inadequado de corticóides tópicos pode levar a um retardo na reepitelização ou ainda provocar destruição celular bem como o uso de degermantes e antissépticos tópicos. O uso indevido de antibióticos tópicos pode criar uma resistência bacteriana ou ainda induzir reações de hipersensibilidade que retardam a cicatrização (HAMEDL., 2016)

2.3 Plantas medicinais e Fitoterapia

As plantas medicinais sempre estiveram ao alcance do ser humano como recurso para tratamento de enfermidades, cujo conhecimentos foram transmitidos por gerações ao longo dos anos. Essa perspectiva tem se fortificado pela crescente necessidade de ajustarmos nossos hábitos para uma vida saudável e próxima de produtos naturais (OLIVEIRA et al., 2007).

O Brasil possui um enorme potencial para desenvolvimento da fitoterapia devido a sua rica e diversa flora, inclusive com aplicação na odontologia onde essas plantas têm sido usadas como anti-inflamatório, antibiótico, analgésico, agentes sedativos e também soluções irrigadoras. Espécies como Cravo da Índia (*Syzygium aromaticum*), Romã (*Punica granatum*), Malva (*Malva sylvestris*), Tanchagem (*Plantago major*), Amoreira (*Morus L.*), Sálvia (*Salvia officinalis*), Camomila (*Matricaria chamomilla*), entre outras são amplamente aplicadas em casos de abscessos, gengivite, aftas e outras afecções bucais. A utilização e comercialização de fitoterápicos eram consideradas práticas de populações de baixa renda, porém atualmente vem se popularizando em todas

as classes sociais. Em alguns países em desenvolvimento até 80% da população depende exclusivamente das plantas medicinais para atenção primária em saúde (GROPPO *et al.*, 2008).

A percepção popular sobre a eficiência do uso de fitoterápicos gera uma divulgação de seus efeitos terapêuticos. Indiretamente esse tipo de cultura aumenta a procura e o interesse da comunidade científica em desenvolver estudos multidisciplinares que só tendem a enriquecer as áreas de conhecimento chamando a atenção para a flora mundial e brasileira. Fitoterápicos movimentam muito a economia em países como a Alemanha, França e Itália. O Brasil apesar de sua rica flora e de ser detentor de um terço da flora mundial não se destaca nesse mercado ficando para trás de países menos desenvolvidos (COUTINHO *et al.*, 2009).

Pela falta de conhecimento científico pelas comunidades acreditava-se que fitoterápicos possuem menos efeitos colaterais e são mais eficazes que medicamentos alopáticos. Entretanto, estudos comprovam que medicamentos naturais podem causar efeito colateral bem como sinergia com outras drogas sendo necessário conhecer suas substâncias ativas e principalmente a procedência do vegetal para que sua utilização seja assegurada o que ratifica a importância do seu estudo (SOYAMA, 2007).

O principal objetivo do uso de fitoterápicos é estimular a prevenção, cura e minimização da sintomatologia, além de ter baixo custo e alta acessibilidade para a população. Desta forma o mercado de produtos naturais tem aumentado significativamente, além de pesquisas que comprovem sua atividade terapêutica, produtos com menor toxicidade e maior biocompatibilidade (OLIVEIRA *et al.*, 2007).

Assim, estudos com associação de plantas medicinais a pomadas orabases vem sendo testadas com intuito de agir na inflamação e diminuir o tempo de cicatrização. Exemplificado por estudos com *Aroeira terenthifolius*, que tem ação antimicrobiana, antiinflamatória e cicatrizante, bem como a *Matricaria chamomilla* também utilizada como anti-inflamatório em estomatites. Estas espécies têm sido amplamente empregadas na medicina popular e vem sendo submetidas a pesquisas odontológica. Apesar do seu amplo emprego, a realidade é a grande escassez de estudos científicos que comprovem seu uso para doenças bucais (GROPPO *et al.*, 2008; MARTORELLI, 2011).

Evangelista *et al* (2013) realizaram um levantamento etnobotânico de plantas medicinais para a identificação das principais espécies indicadas e usadas para tratamento de afecções bucais na cidade de Manaus. Nessa pesquisa foram entrevistados usuários do serviço odontológico, bem como Cirurgiões dentistas e comerciantes credenciados na prefeitura de Manaus. Seus resultados demonstraram a existência de comércio de plantas medicinais para afecções bucais, as mais usadas são as seguintes espécies: Pedra ume cãa (*Aulomyrcia sphareocarpa*), Crajiru (*Arrabidaea chica*), além da Sara tudo (*Bysonima intermedia*). Nos resultados observou-se que 8% dos Cirurgiões dentistas e 7,61% dos pacientes utilizam plantas medicinais para afecções bucais, e dessa maneira concluíram que a utilização das plantas medicinais em Manaus é empírica sendo urgente a necessidade de estudos que comprovem sua eficácia para que seu uso se difunda de maneira correta.

2.3.1 *Libidibia ferrea* L.

Libidibia ferrea L. pertence à família das Leguminosas-cesalpiniáceas, conhecida como jucá, pau de ferro ou jucaína, amplamente utilizada na medicina popular. Comumente, seu uso se dá a partir da casca do caule da árvore do jucá em decocção, cuja ação é cicatrizante e expectorante. Além de combater doenças do trato respiratório, diabetes sacarina, ação antiulcerante, hemostática, anti-inflamatória, antibacteriana e antihelmíntica (BALBACH, 1992).

Apesar do número reduzido de plantas cientificamente estudadas do ponto de vista químico, farmacológico ou agrônômico a flora amazônica é considerada a maior reserva de plantas medicinais no mundo. E neste bioma que se encontra a espécie *Libidibia ferrea* L. também conhecida como jucaína, jucá, pau de ferro e birá-obi. Também encontrada no nordeste do Brasil, caracteriza-se por uma árvore de porte médio, com madeira muito dura, por vezes difícil de ser trabalhada, lenho roxo ou castanho, cerne escuro, manchado por máculas amarelas finas, fibras finas e arrevesadas, folhas ovais e verdes em formas de palma. Pode ser utilizada em forma de chá das folhas, frutos ou da casca, como xarope da casca, e em forma de tintura feita com o fruto (BORRÁS, 2003).

Carvalho *et al.* (1996) e Soares *et al.* (2006) afirmaram que o jucá (*Libidibia ferrea*) e a aroeira (*Schinus terebinthifolius*) apresentam atividade

analgésica, anti-inflamatória, antiulcerôgenica e antibacteriana. Nozaki *et al.* (2007) demonstraram que o jucá possui atividade quimiopreventiva de câncer, antibacteriana, anti-hipertensivo e antifúngica.

No Nordeste o pó da casca de *Libidibia ferrea* L. é amplamente usado pela população para tratamento de feridas na pele. Dessa forma, a utilização e comercialização do pó dessa espécie para aplicações na medicina popular aumenta o interesse de estudos científicos para comprovar sua efetividade (SAMPAIO *et al.*, 2009).

Conde (2006) e Sampaio *et al* (2009) realizaram estudos com extratos da espécie vegetal *L. ferrea* e os resultados demonstraram um grande potencial do Jucá sobre microrganismos do biofilme dental. Marreiro *et al* (2014) propuseram o uso do extrato da vagem desta planta como enxaguatório bucal, incorporando à formulação, o extrato do vegetal liofilizado obedecendo a CIM. Venâncio *et al*, 2015 realizaram um estudo com a finalidade de aprimorar a formulação de um enxaguatório bucal à base de extrato da espécie vegetal *L. ferrea*, visando o uso na prevenção ou tratamento de doenças bucais.

No processo de avaliação de uma formulação é importante realizar também ensaios toxicológicos para a verificação da segurança e o risco/benefício do possível uso terapêutico (EVANS, 2009; NÓBREGA *et al*, 2008).

Venâncio *et al.*, 2015 avaliou no teste de cultura de células pelo método de Alamar Blue™ a viabilidade das células frente ao enxaguatório de *L. ferrea* nos tempos (0, 30 e 60 dias), do extrato, do veículo e da clorexidina a 0,12%. O tratamento correspondeu ao período de 72 horas em cultura de fibroblastos humanos (MRC-5). Após a análise dos resultados foi possível verificar que nenhuma amostra testada foi capaz de induzir efeito citotóxico quando em contato com as células, apresentando valores de CI50 (Concentração Inibitória) acima de 50 µg/ mL.

Em estudo fitoquímico do extrato da casca do Jucá verificou-se a presença de saponinas, flavonoides, taninos, cumarinas esteroides e compostos fenólicos. Majoritariamente verifica-se taninos no extrato que podem ser responsáveis pela ação antidiabética (CAVALHEIRO *et al.*, 2009). Barakat (2011) verificou em seu estudo alto teor de taninos totais de (19%) em extrato aquoso de Jucá, que demonstra um valor relativamente alto comparado a outras espécies de vegetais.

Kobayashi *et al.* (2015) afirma em seu estudo que a concentração do extrato pode influenciar em uma melhor reepitelização de feridas, diminuindo o tempo de cicatrização e eles afirmam que a ação antimicrobiana e o poder cicatrizante do extrato de *Libidibia ferrea* seja explicado pela presença de taninos em sua composição.

Cavalher-Machado *et al.* (2008) afirma que a atividade antifúngica e antimicrobiana é maior no extrato da casca do caule do que no fruto. Além desse extrato não apresentar ação tóxica aguda, hemolítica, heparinásica. Enfatizando assim a necessidades de estudos complementares para identificação dos demais compostos nesses extratos e visando comercialização como fitoterápico.

2.4 Estudos de Citotoxicidade celular

A potência dos princípios ativos contidos na matéria prima e nas formulações pode ser avaliada através de ensaios biológicos a partir de reagentes biológicos como microrganismos, animais, fluídos e órgãos de animais. No processo de avaliação de determinado produto é necessário certificar sobre sua efetividade, riscos e benefícios à saúde de homens, animais e ao meio ambiente. Sendo assim, os ensaios toxicológicos avaliam a segurança e a relação risco/benefício no uso de novos medicamentos (TEIXEIRA *et al.*, 2011).

Venâncio *et al.*, 2015 avaliaram a citotoxicidade de soluções testes (Formulação de enxaguatório bucal a base de *Libidibia ferrea* L., extrato de *Libidibia ferrea* L., os veículos presentes no enxaguatório e o controle positivo Clorexidina à 0,12%) nos tempos (0, 30 e 60 dias), com o extrato da planta, com o veículo do enxaguatório e com a clorexidina a 0,12%, através dos testes de hemólise e cultura de células. No teste de hemólise avaliou-se a capacidade das substâncias testes em causar ou não lesões na membrana plasmática da célula, verificando-se que o enxaguatório de *L. ferrea* não apresentou atividade hemolítica nos tempos experimentais, porém o veículo do enxaguatório e a clorexidina a 0,12% causaram hemólise com CE50 de 300,5 e 75,14 µg/ mL respectivamente, tal resultado foi considerado satisfatório visto que a concentração do veículo na formulação do enxaguatório é inferior à concentração efetiva de hemólise.

A ANVISA, principal órgão responsável pela regulamentação, fez a melhoria dos processos de registros e controle de qualidade dos fitoterápicos a partir de 2004 após a publicação da RDC 48/2004 que estabelece as informações essenciais para o registro, como identificação botânica das espécies vegetais que são utilizadas, padrão de qualidade e provas que validem a eficácia e segurança das indicações terapêuticas. A RE 89/2004, RE 90/2004 e RE 91/2004 compõe as resoluções utilizadas para execução de testes de eficácia e segurança são importantes para o registro de qualquer medicamento desta classe.

Na Odontologia, uma gama de materiais utilizados em clinica podem entrar em contato com células da mucosa oral, gengiva ou mesmo com tecidos dentais, por isso ratifica-se a necessidade de testes de biocompatibilidade, carcinógenos e ou mutagênicos de todos os materiais que vão a cavidade oral. Inicia-se com a avaliação biológica de materiais com um estudo citotóxico utilizando testes *in vitro*, e somente a partir de resultados satisfatórios nesta primeira etapa, que poderão ser realizados testes *in vivo* para avaliação de do comportamento biológico do material (SANTOS *et al.*, 2008).

Ingredientes cosméticos de origem natural, biomateriais, sintéticos ou associação de ingredientes tem que ser submetidos a avaliação rigorosa e com um forte delineamento científico para a avaliação desses materiais, afim de fornecer bases adequadas para formulação de produtos seguros (ANVISA, 2012).

A caracterização da citotoxicidade é fundamental para avaliação dos efeitos biológicos que determinada droga pode causar. Expõe-se uma cultura celular ao biomaterial de interesse e a partir de então é possível identificar reações adversas de citotoxicidades resultantes. Ensaio de citotoxicidade são divididos em três categorias: 1) contato direto, 2) por extrato e 3) Difusão em ágar, estes se diferenciam pela maneira como as células são expostas ao material que está sendo testado. Os ensaios de contato direto e o por extrato avaliam quantitativamente e qualitativamente a presença e a severidade da toxicidade do material, já o por contato indireto avalia apenas qualitativamente ao fim do ensaio (MASSON e LOMBELLO.,2016).

A avaliação da citotoxicidade permite esclarecer o mecanismo biológico pelo qual o efeito toxico é desencadeado e o mecanismo de ação de materiais

durante a interação material/tecido. Porém o teste de citotoxicidade *in vitro* apresenta limitações tais como a cultura de células em monocamadas não representa fielmente a organização do tecido *in vivo*, onde as células ali presentes poderiam auxiliar em um reparo ao trauma superficial. A presença do efeito citotóxico *in vitro* não garante que o biomaterial seja tóxico quando aplicado *in vivo*, entretanto a ausência de toxicidade *in vitro* garante uma boa aplicação clínica (SENNE *et al.*, 2008).

As células mais comumente utilizadas em cultura são os fibroblastos devido suas características de proliferação, porém efeitos deletérios provenientes do contato direto com substâncias tóxicas resultam em alterações de morfologia tais como, vacuolização do citoplasma, granulações no núcleo, alteração da forma celular, pelo descolamento da superfície à qual estão aderidos (FRESHNEY, 1994). Por isso pesquisas atuais realizam citotoxicidade para biomaterias *in vitro*, usando culturas oriundas de linhagens obtidas comercialmente e culturas de células primárias feitas em laboratórios individuais (SOUZA *et al.*, 2006).

A avaliação de citotoxicidade é importante na pesquisa de substâncias menos tóxicas e seletivas com atividade antimicobacteriana, sendo importante que ela seja inócua e com baixa toxicidade, assim a determinação do IC (índice de citotoxicidade) de um biomaterial pode ser realizado *in vitro*. Um exemplo de índice de citotoxicidade é o IC90 que identifica 90% da viabilidade celular sendo identificado como fator determinante da mudança do corante reagente Alamar blue de azul para rosa. Logo depois calcula-se o IC50 que é a concentração onde ocorre 50% de morte celular e ele é calculado a partir do IC90. Depois de calculado esses dois valores, faz-se o índice de seletividade (IS) através da razão IC90/IC50 e então se estabelece a segurança em passar um estudo *in vitro* para *in vivo* (PROPTOPOPOVA *et al.*, 2005).

A determinação da viabilidade celular vem sendo testada com sucesso através do corante alamar blue desde 1993. O mesmo tem sido empregado por não apresentar citotoxicidade, não interferindo na leitura do experimento. Portanto, é considerado um método simples, rápido, sensível e seguro, haja visto que o corante não deve interferir com o material que vai ser analisado (FIELDS *et al.*, 1993).

A viabilidade celular também pode ser determinada pelo ensaio de exclusão por Azul Tripán. Nele as células colocadas em suspensão, e a avaliação é feita a partir da verificação da integridade da membrana celular e a capacidade que a célula tem de expulsar o corante o que não acontece com células inviáveis. Nesse teste as células são colocadas em contato com o corante e levadas ao microscópio para leitura. As células viáveis são as não coradas e as inviáveis coradas em azul (STROBER,2001).

A análise da citotoxicidade é importante pois permite compreender o mecanismo biológico que produz a citotoxicidade e a interação do biomaterial com o tecido. MARREIRO et al. (2014) testaram a citotoxicidade de um enxaguatório de jucá através do teste de cultura celular com fibroblastos e concluíram que essa formulação foi tóxica para cultura celular, mas para teste de hemólise não, justificando-se assim a importância de realizar testes *in vitro* antes de testes *in vivo*.

Outra forma eficiente de avaliar a integridade celular é verificando as alterações morfológicas causadas ou não por determinada droga, após exposição a droga as células são coradas em Hematoxilina e eosina e então levadas a microscopia óptica para interpretação, comparando-as em tratadas ou não tratadas. Observa-se então a integridade do citoplasma e núcleo basófilos, condensação de cromatina, Lise celular e presença de vacúolos citoplasmáticos (VASCONCELLOS et al., 2007).

2.5 Genotoxicidade

Alguns danos causados por agentes químicos ao material genético presente dentro de uma célula pode ser mensurado e assim determinar o nível de genotoxicidade de um material. Esses danos podem causar mutações induzindo modificações na sequência de nucleotídeos, ou mesmo mudanças na estrutura da fita de DNA de uma célula (VALENTE et al., 2016). O método mais comum para determinar o dano ao DNA é através do ensaio do cometa. Este teste depende do relaxamento da fita espiral do DNA em nucleóides mergulhados em agarose, que primeiro ficam em solução de lise para desnaturação das proteínas da parede celular e nuclear, isso permite que o DNA seja atraído em direção ao anodo em eletroforese, formando imagens semelhantes a cometas, sendo visualizadas em microscopia de fluorescência

ressaltando assim a quantidade de DNA na cauda o que determina a quantidade de dano ao DNA. Estudos afirmam que este ensaio está em constante desenvolvimento, haja vista suas inovações recentes, mais ainda sim representa um teste simples e sensível para identificação de dano ou mutação do DNA (KUMARAVEL *et al.*, 2009; AZQUETA E COLLINS, 2013).

Neste teste a fração de migração do DNA é medida através da visualização de caudas semelhantes a cometas após eletroforese. A análise deste teste se dá pelo tamanho da cauda que nada mais é do que DNA fragmentado em relação a cabeça do cometa. Assim 4 níveis de comprimento foram determinados por OLIVE E BANATH (1995).

Pickler *et al.*, (2019) pesquisaram em ratos a fetotoxicidade e a toxicidade em relação a mãe de um extrato hidroalcoólico da casca e da semente de jucá através de cromatografia líquida de alta eficiência e encontraram resultados de toxicidade materna e no feto. Os fetos expostos aos extratos de *L. ferrea* apresentaram menores comprimentos médios das seções de cabeça e corpo quando comparados aos de C e exibiram anomalias viscerais e esqueléticas, as ratas grávidas expostas aos extratos de *Libidibia ferrea* L. mostram alterações nos níveis séricos de creatinina e produzem líquido amniótico com composição bioquímica anormal.

3.OBJETIVOS

3.1 Geral

Avaliar *in vitro* o efeito citotóxico e genotóxico de uma pomada orabase formulada a partir do extrato da casca do jucá.

3.2 Específicos

- Determinar o nível de citotoxicidade da pomada através dos testes de Cultura de células com coloração de Alamar Blue, Coloração por Azul de Tripan e Coloração por Hematoxilina e eosina.
- Determinar o nível de genotoxicidade da pomada orabase de jucá através do Teste Cometa em pH alcalino e neutro.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Desenho do estudo

Esse estudo é uma pesquisa experimental laboratorial *in vitro* classificado como primário, longitudinal, prospectivo, quantitativo e descritivo para avaliar a citotoxicidade e genotoxicidade de uma formulação em pomada orabase formulada à base de extrato de jucá (*Libidibia ferrea* L.).

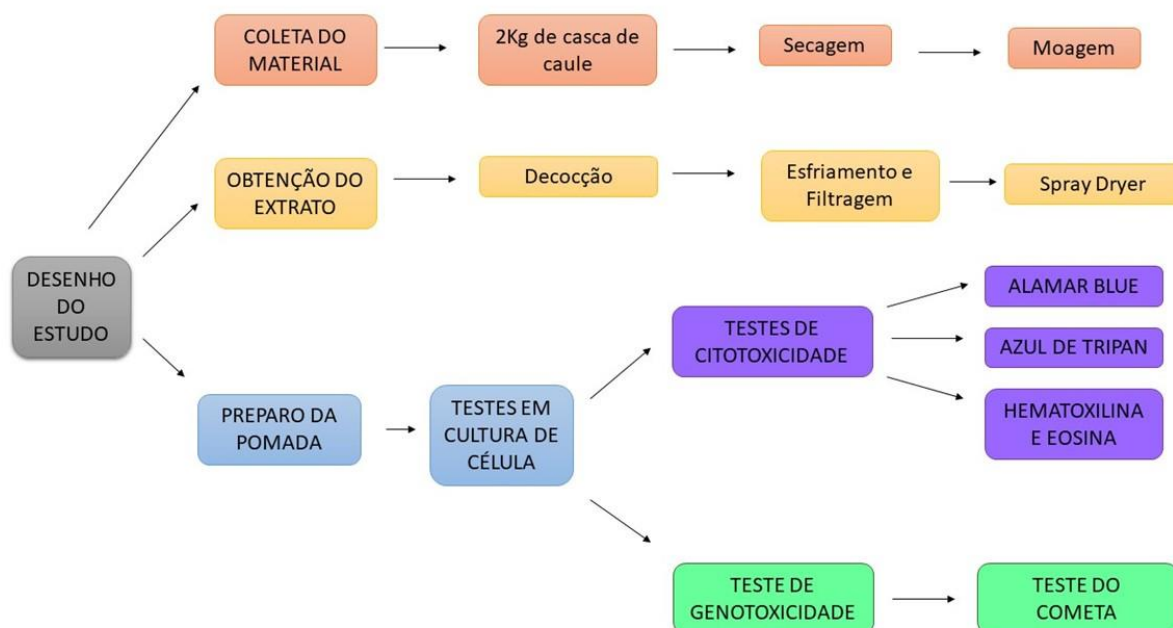


Figura 1 – Representação esquemática do desenho de estudo

Este estudo foi conduzido pela Faculdade de Odontologia da Universidade Federal do Amazonas (FAO/UFAM) em parceria com a Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal do Amazonas (FCF/UFAM), nos laboratórios de Cultura de células (FCF), Laboratório de Tecnologia Farmacêutica (FCF), Laboratório de Imagem e Biologia Celular (FCF) e Laboratório de Atividades Biológicas de Fitoterápicos na Odontologia (FAO). Os testes foram realizados com a equipe dos respectivos laboratórios e financiado através do CNPq (Chamada nº 77/2013 – CT Amazônia, Processo Numero 406457/2013-1. .

4.2 Coleta do material Vegetal (*L. ferrea* L.)

Foi utilizado como matéria prima vegetal para este estudo a casca do caule da *Libidibia ferrea* L. (Figura 2). As mesmas foram coletadas em uma quantidade suficiente para o desenvolvimento do estudo, aproximadamente 2kg. O processo de coleta foi supervisionada por um etnobotânico e realizado na cidade de Manaus em área do Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia (INPA), no qual excicata está registrada sob o número 228.022. As mesmas foram transportadas para a Faculdade de Ciências Farmacêuticas (FCF) da Universidade Federal do Amazonas (UFAM), onde foram processadas seguindo a metodologia descrita de VENÂNCIO *et al.* (2014).



Figura 2 – Árvore *Libidibia ferrea* localizada na área do Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia – INPA.

A casca do caule de *Libidibia ferrea* L. foi selecionada devido ser uma matéria-prima disponível o ano todo e a fim de eliminar a dependência da sazonalidade da vagem. A casca do caule da espécie *L. ferrea* L. foi colocada para secar a temperatura ambiente por 48 horas, a sombra, em lugar seco e arejado (Figura 3). Em seguida, submetido à secagem em estufa de ar circulante, à temperatura de 40°C, até estabilização da umidade residual. Após a secagem, a porção vegetal foi submetida à moagem em moinho de facas, a fim de obter a matéria-prima vegetal (MPV – Figura 3).

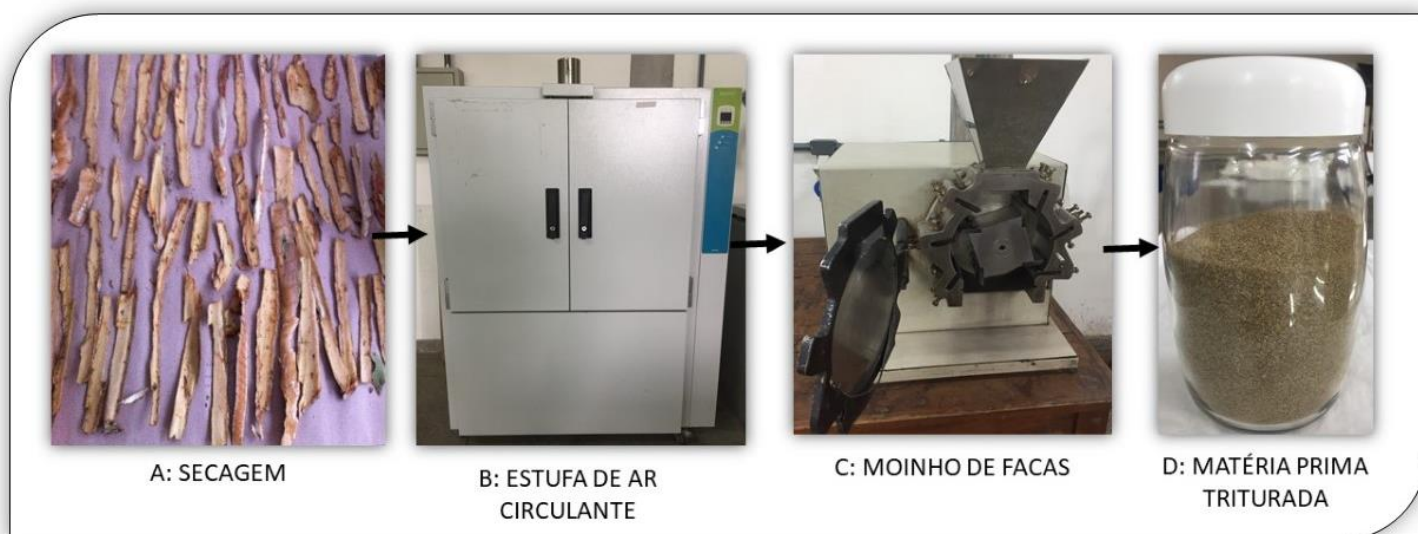


FIGURA 3 - Processamento da matéria prima vegetal . A- Secagem em Temperatura Ambiente; B- Secagem em Estufa de Ar circulante; C – Fragmentação da Amostra em Moinho de Facas; D- Matéria prima triturada pronta para processo de extração.

4.3. Obtenção do extrato (*L. ferrea* L.)

Durante o preparo do extrato foram utilizados os princípios de assepsia para que a qualidade do material fosse preservada. O método para obtenção do extrato obedeceu a padronização estabelecida por Pereira et al., (2014) em que determinou a concentração a 7,5% como de melhor resultado. Sendo assim, foi obtido o extrato através da técnica de decocção por refluxo com uma relação droga: solvente de 7,5% (m/V) utilizando água e etanol como líquido extrator, na proporção de 1:1, ambos em uma quantidade de 500mL. Misturou-se o solvente com a água e o etanol em um balão volumétrico de 2.000 ml e o mesmo foi levado ao equipamento aquecedor – Manta Aquecedora. O material extraído foi retirado, esfriado e filtrado em um balão volumétrico de 1.000 mL e o volume foi completado com água destilada até alcançar 1.000 mL (Figura 5).

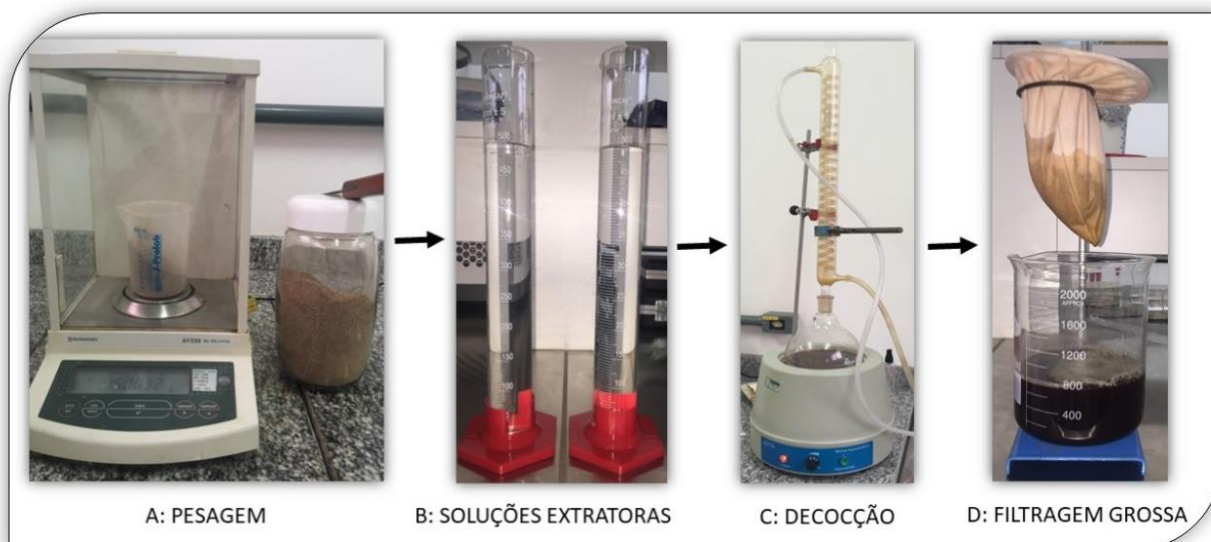


FIGURA 4 - Preparação do extrato

A solução extrativa de jucá foi levada para o aparelho Spray Dryer (modelo MSD 1.0) para que fosse obtido o extrato seco por aspersão, visando reduzir a pó e manter a sua estabilidade, como mostra na figura 6.



FIGURA 5 - – Obtenção do extrato de Libidibia ferrea à seco

4.4 Rendimento do extrato seco de Jucá

O extrato hidroalcoólico de jucá após a secagem por aspersão obteve um rendimento total de aproximadamente 114g (114,943g – figura 7). O Jucá foi armazenado em dois recipientes de vidro, e um de plástico, bem lacrados e em temperatura ambiente.



FIGURA 6 – Rendimento do extrato à seco a 7,5%

4.5 Preparo da pomada orabase (*Libidibia ferrea* L.)

A concentração do extrato na formulação da orabase foi determinada com base no resultado da concentração inibitória mínima (37,5 mg/mL) que foi determinado na primeira fase dos estudos com o jucá, testados contra microrganismos da cavidade oral (OLIVEIRA et al, 2013). A pomada, obedecendo aos princípios da fitoterapia, os quais enfatiza o uso da matéria-prima vegetal sem isolados, tem como principal composto a *Libidibia ferrea* L. a 2% de extrato e teve apresentação final em bisnaga 10g.

A formulação é composta apenas por fase oleosa representada por: vaselina sólida (80%), óleo mineral (17%), CarboxiMetilCelulose (0,5%), Propilparabeno (0,15%), conforme demonstrado na Tabela 1.

COMPONENTES	PROPORÇÃO
Vaselina sólida	80%
Vaselina líquida	17%
Carboximetilcalulose	0,5%
Propilparabeno	0,15%
Extrato a seco à 7,5%	2%

Tabela 1- Composição da pomada orabase de *Libidibia ferrea*

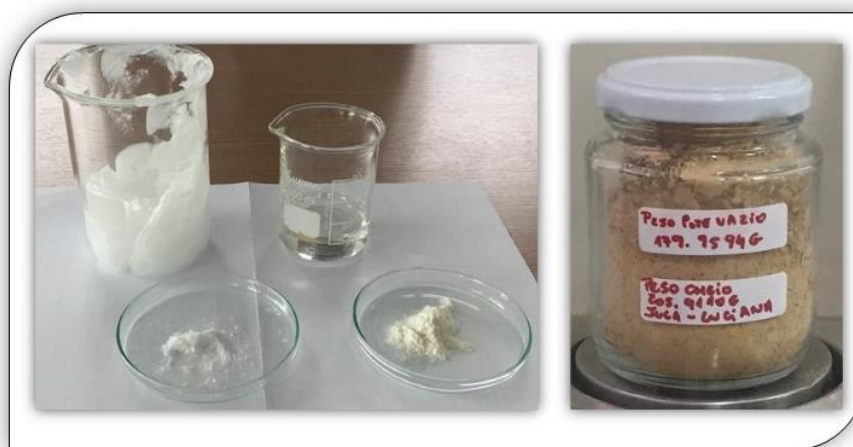


FIGURA 7 – Componentes da pomada

Os componentes da pomada foram aquecidos até 75°C no equipamento de Banho maria SL 155/10, utilizou-se um termômetro de mercúrio para a aferição como mostra a Figura 9.

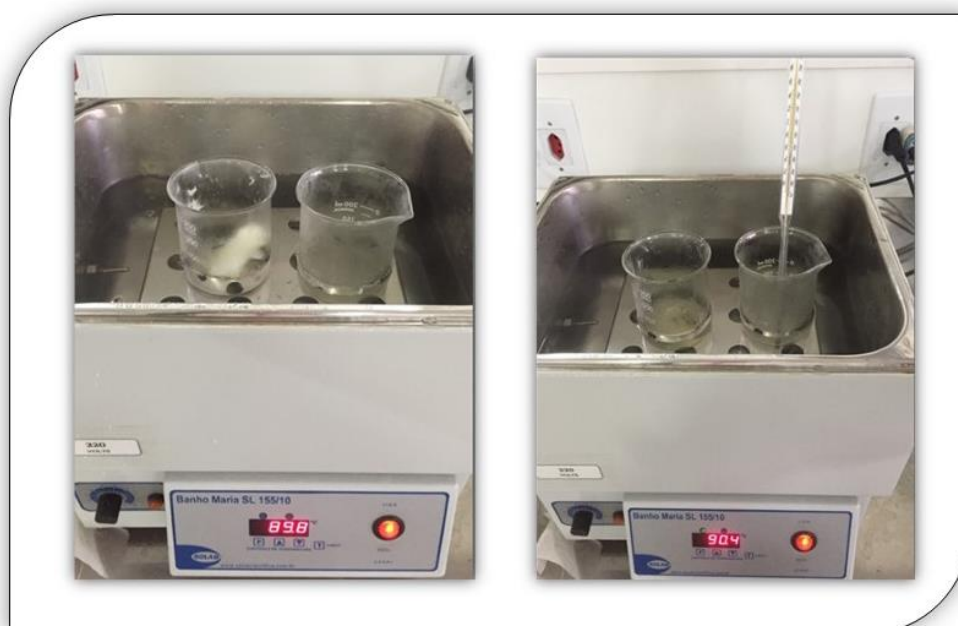


FIGURA 8- Aquecimento em banho maria até atingir 60°C



FIGURA 9- Manipulação e aspecto final da pomada

4.6 Testes em Cultura de Células

Foram utilizados Fibroblastos Humanos não neoplásicos (MRC-5), cultivados em garrafas de cultura contendo meio de cultura *Dulbeco's Modified Eagle Medium* (DMEM) suplementado com 10% de Soro Fetal Bovino (SFB) e 1% de antibiótico Ampicilina-Estreptomicina. As células foram mantidas em incubadora com 5% de CO₂, a 37° C, e posteriormente foram manipuladas em fluxo laminar.



FIGURA 10 – Cultivo de células em fluxo laminar

4.6.1 Solubilização da substância teste

Considerando que a pomada orabase não possui fase aquosa, e o meio de cultura é aquoso, houve necessidade de solubilizar a pomada em DMSO para preparo da solução estoque afim de que a não houvesse precipitação de alguma fase da pomada quando em contato com o meio de cultura. A concentração final da solução estoque foi de 20 mg/mL. Para os ensaios a solução estoque (pomada diluída) foi diluída só que em meio de cultura para as concentrações teste 25, 50 e 100 µg/mL para preparo das substâncias testes.

4.6.2 Testes de Citotoxicidade

4.6.2.1 Alamar Blue

O teste do Alamar Blue foi realizado para a avaliação citotóxica das diferentes concentrações em que foram testadas a formulação em orabase de jucá em fibroblastos humanos (MRC-5). Foi desenvolvido conforme metodologia descrita por Ahmed *et al.* (1994), com modificações. As células foram transferidas para microplacas de 96 poços na densidade $0,5 \times 10^4$ células por poço, e armazenadas em estufa a 37°C com 5% de CO₂.

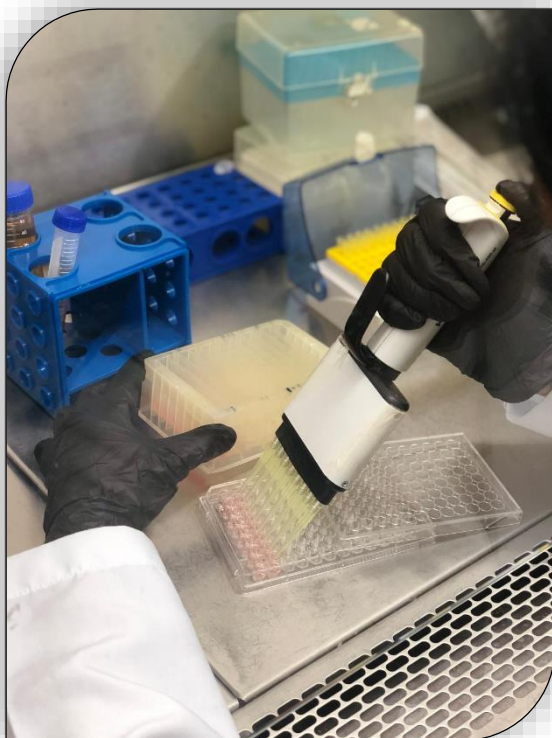


FIGURA 11 – Tratamento com as soluções teste

Após 24 horas, as células receberam o tratamento com as substâncias teste nas concentrações de 25,50 e 100 $\mu\text{g/mL}$. Como controle negativo foi utilizado DMSO (0,2%), e como controle positivo Doxorrubicina, na concentração de 5,0 $\mu\text{g/mL}$. O período de tratamento foi de 72 horas, com a placa mantida em estufa a 37°C com 5% de CO_2 . Após esse período foi adicionado 10 μL do Alamar blue (0,02%), posteriormente feita a leitura das placas em leitor de microplaca, nos comprimentos de onda de excitação de 530 nm e emissão de 590 nm.

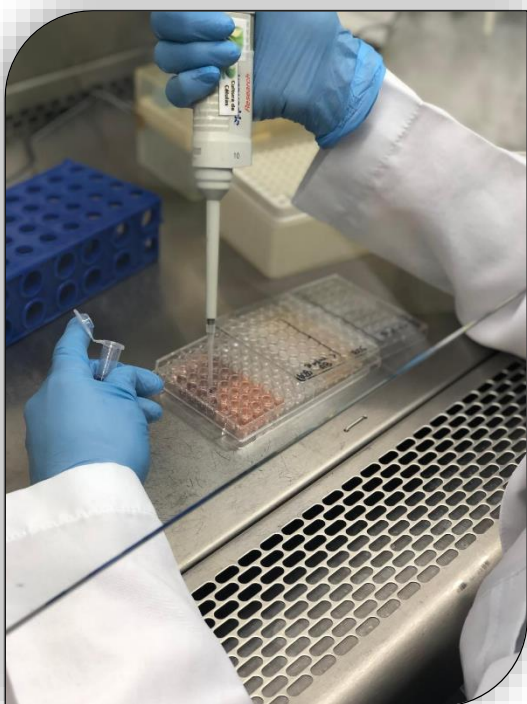


FIGURA 12 – Adição de Alamar Blue aos poços da placa



FIGURA 13 – Leitura em leitor multiplaca

4.6.2.2 Azul de Tripán

O teste por Azul de tripan foi realizado para a avaliação de viabilidade celular nas diferentes concentrações em que foram testadas a formulação em orabase de jucá em fibroblastos humanos (MRC-5). Foi desenvolvido conforme metodologia descrita por FRESHNEY, *et al.* (1987), com modificações.

Para a realização do ensaio, as células foram plaqueadas na densidade $1,5 \times 10^4$ células por poço em placas de 24 poços. Decorridas 24 h, o meio foi retirado e, então adicionadas as substâncias teste (formulação em orabase de *Libidibia ferrea* L. (Jucá) nas concentrações de 25, 50 e 100 $\mu\text{g/mL}$, controle negativo DMSO 0,2% e controle positivo Doxorrubicina 10 μM). Após o período de tratamento de 72h as células foram colhidas e centrifugadas a 1500rpm por 3 minutos (Figura 14)

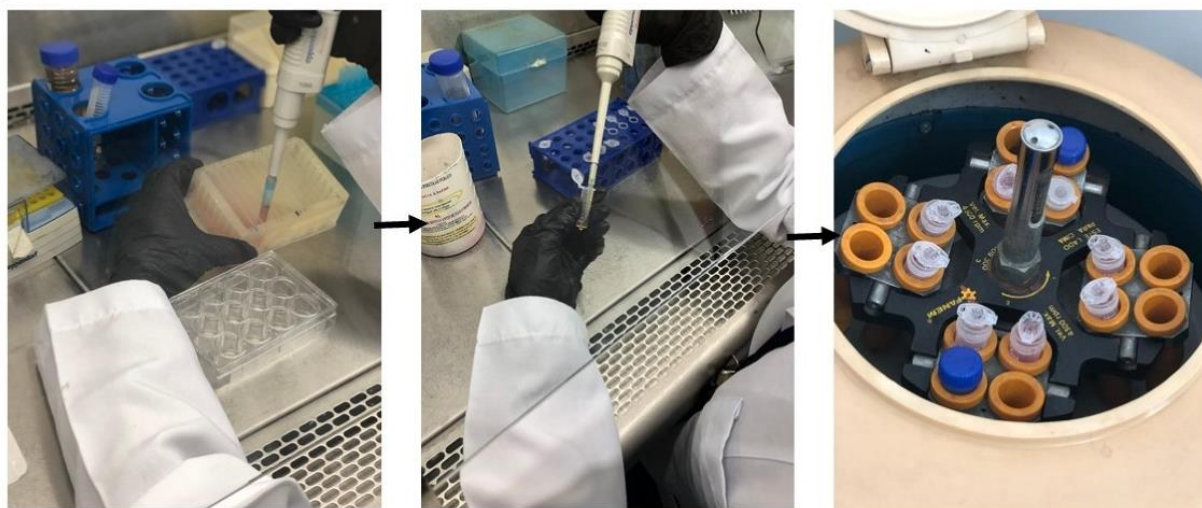


FIGURA14- Ensaio de azul de tripan

O sobrenadante foi descartado e o *pellet* de células ressuspendido com 90 μL de meio DMEM completo. Decorridos 2 minutos, 10 μL da suspensão de células foi transferido para uma câmara de Neubauer, foram adicionados 10 μL de Tripán Blue e foram contadas as células viáveis e as não-viáveis.



FIGURA 15- Aplicação e leitura de azul de tripan

4.6.2.3 Hematoxilina e Eosina

Com o intuito de avaliar a ocorrência de alterações morfológicas causadas pela pomada de *L. ferrea* L., células foram cultivadas na densidade de $3,0 \times 10^4$ células/mL em placas de 24 poços e tratadas com solução teste nas concentrações de 25, 50 e 100 $\mu\text{g/mL}$, controle negativo DMSO 0,2% e controle positivo Doxorrubicina 10 μM .

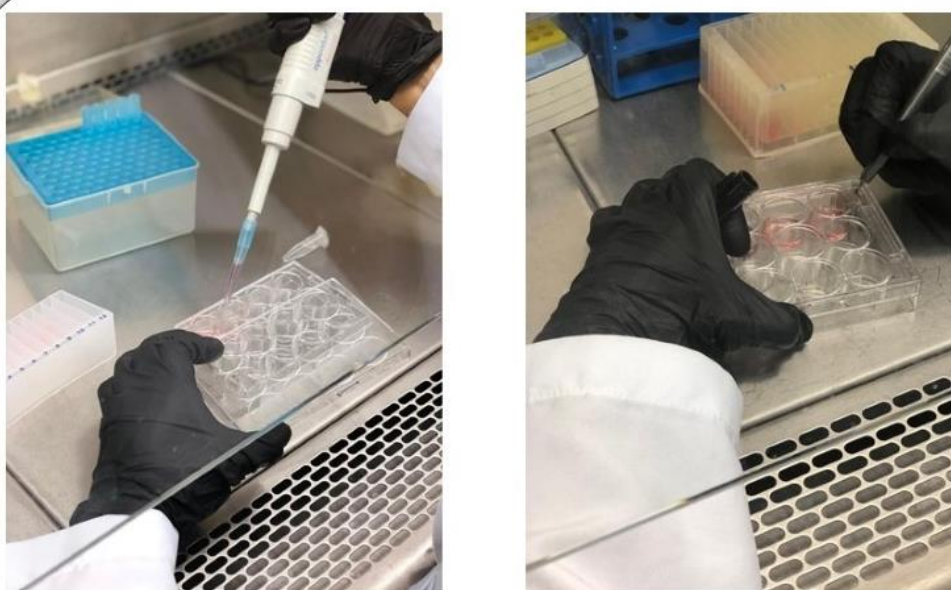


FIGURA 16 – Tratamento com soluções teste e identificação

O sobrenadante dos poços e as células (após tripsinização) foram coletadas em microtubos após 72h. Em seguida, a solução foi centrifugada a 3000 rpm por 5 minutos, o sobrenadante desprezado e o *pellet* ressuspenso em 200 μ L de PBS. Após esse processo, uma alíquota de 100 μ L foi retirada e centrifugada por 5 minutos a 1000 rpm. Após a centrifugação as células aderidas nas lâminas foram fixadas e coradas com kit corante panótico rápido LaborClin®.

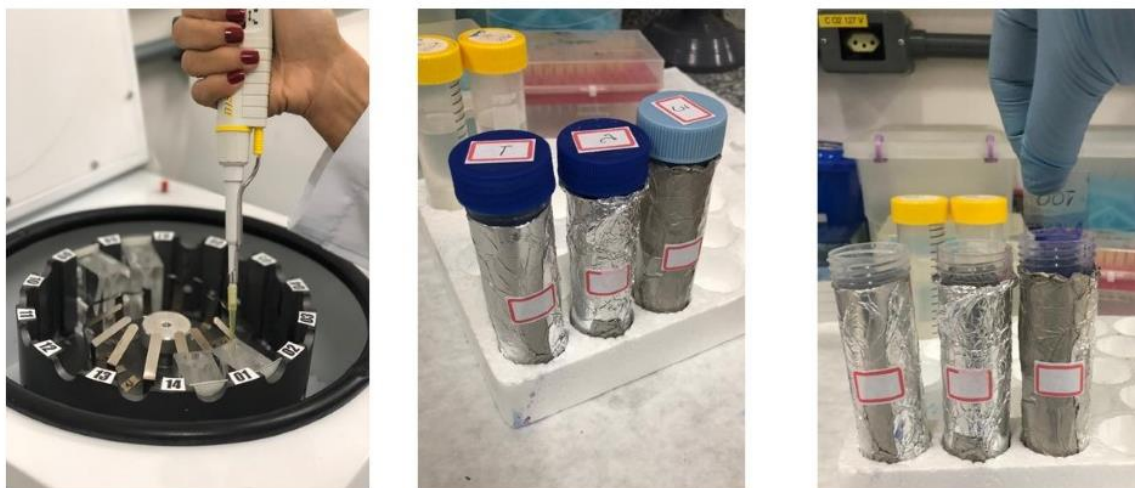


FIGURA 17 – Centrifugação e Coloração com H.E

As lâminas foram então analisadas em microscópio óptico, para avaliação das alterações morfológicas comparando-se as células tratadas e não tratadas. O registro das alterações celulares foi feito por fotografias (VASCONCELLOS et al, 2007).

4.6.3 Teste de Genotoxicidade

4.6.3.1 Teste do Cometa em pH Alcalino e Neutro

O ensaio para avaliação da genotoxicidade foi realizado pelo método do cometa de célula única em pH alcalino e pH neutro conforme metodologia descrita por SINGH et al. (1988; TICE et al. (2000), WOJEWÓDZKA; BURACZEWSKA; KRUSZEWSKI (2002) com modificações. As células de fibroblasto humano (MRC5) foram tratadas por 3 horas com a formulação em orabase de *Libidibia ferrea* L. (Jucá) nas concentrações de 25, 50 e 100 µg/mL, controle negativo DMSO 0,2% e controle positivo Doxorubicina 10 µM.

Após tratamento, as células foram ressuspensas em meio de cultura com o auxílio de Tripsina e o conteúdo foi centrifugado durante 5 minutos a 1500 rpm. O sobrenadante foi descartado e o pellet celular foi incorporado a uma solução de Agarose de Baixo Ponto de Fusão (LMP). Em seguida, o conteúdo foi transferido para lâminas de microscopia previamente cobertas com Agarose de Ponto de Fusão Normal (NMP).

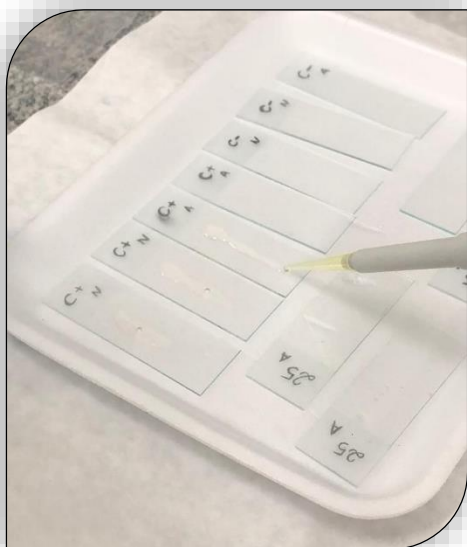


FIGURA 18 – Lâmina sendo tratadas com agarose

Após a gelificação da agarose em temperatura de 4°C, as lâminas foram colocadas em solução de lise por no mínimo 1 hora para a desnaturação da parede celular e nuclear, restando o DNA da célula. As lâminas foram então removidas da solução de lise e dispostas horizontalmente na cuba de eletroforese preenchida com solução de eletroforese por 20 minutos para permitir o desempacotamento do DNA.



FIGURA 19 – Lâmina em solução de lise

A eletroforese foi conduzida na ausência de luz por 30 minutos, a 20 Volts para o cometa em pH Alcalino e 25 Volts para o cometa em pH Neutro. Posteriormente, as lâminas foram dispostas em recipientes contendo solução de neutralização por 5 minutos. Por fim, as lâminas secas, foram fixadas em etanol absoluto e armazenadas para posterior leitura. As lâminas foram analisadas em microscópio de fluorescência, utilizando 40 μ L da solução de Syber Green (1:10000).

Foram contados 50 cometas por lâmina ($n=2$ por exposição em triplicata), sendo classificados de acordo com a quantidade de DNA fragmentado na cauda do cometa, indicando o grau de quebra do DNA (0 – sem dano, 1 – cauda menor que o diâmetro do nucleóide, 2 – cauda do mesmo tamanho que o diâmetro do nucleóide, 3 – cauda maior que o diâmetro do nucleóide, e 4 – cauda 2 ou mais vezes maior que o diâmetro do nucleóide).

Os resultados foram expressos como índice de dano e frequência de dano usando os seguintes cálculos:

Índice de Dano Total = $0 \times (\text{n. de cometas grau } 0) + 1 \times (\text{n. de cometas grau } 1) + 2 \times (\text{n. de cometas grau } 2) + 3 \times (\text{n. de cometas grau } 3) + 4 \times (\text{n. cometas grau } 4)$.

Frequência de dano = $100 - (50 - \text{n}^\circ \text{ de cometas do grau}) \times 100/50$.

4.7 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Para os ensaios de citotoxicidade frente a fibroblastos humanos (MRC-5) foram realizados experimentos em triplicata e os valores obtidos foram utilizados para cálculos de CI50, a partir das curvas de concentração dose-resposta, com intervalo de confiança de 95%.

As análises estatísticas dos demais ensaios foram realizadas por análise de variância (ANOVA) *one-way*, seguido de teste Tukey e Bonferroni para comparação entre os grupos. Os valores com $p < 0,05$ foram considerados estatisticamente significativos.

Todos os experimentos foram realizados em triplicata biológica e os dados foram analisados no programa Graph Pad prism 6.0.

5. RESULTADOS

5.1 Citotoxicidade por alamar blue

Pelo método de Alamar Blue foram avaliadas a viabilidade das células frente a formulação orabase de *Libidibia ferrea* L. em três concentrações distintas 25, 50 e 100 µg/mL. O tratamento correspondeu ao período de 72 horas em cultura de fibroblastos humanos (MRC-5) e o DOXO foi utilizado como droga padrão controle positivo CI50 2,23 µM. Abaixo segue o efeito em percentagem das concentrações testadas:

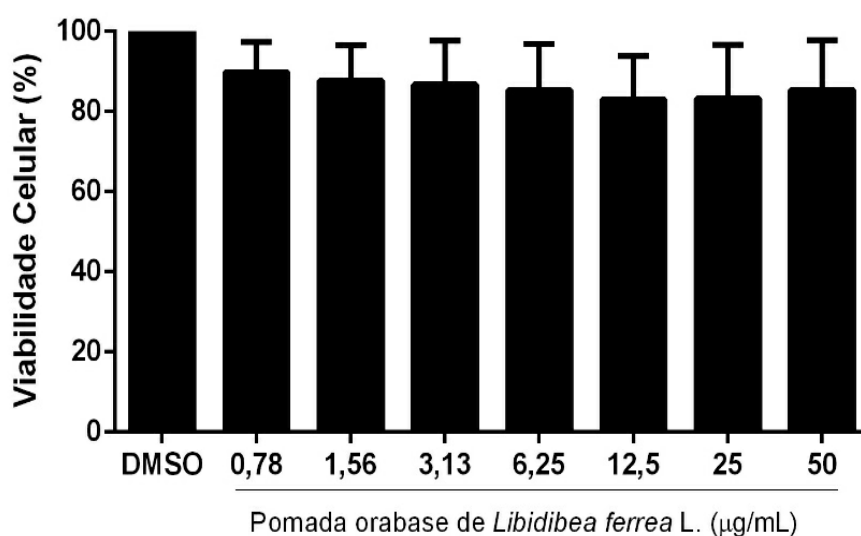


Gráfico 1- Efeito citotóxico da pomada contendo jucá na linhagem celular de fibroblasto humano (MRC-5) utilizando o ensaio Alamar blue, no tempo de tratamento de 72h.

De acordo com resultados obtidos através do ensaio *in vitro* alamar blue, a amostra não apresentou citotoxicidade elevada até a maior concentração testada. O valor de CI₅₀ é >50 µg/mL na linhagem MRC-5, com média percentual de 81,25% de viabilidade celular.

5.2 VIABILIDADE CELULAR POR EXCLUSÃO DO CORANTE AZUL DE TRIPAN

No ensaio de azul de tripan após a coloração das células elas foram levadas a câmara de Neubauer e contabilizadas em viáveis e não viáveis.

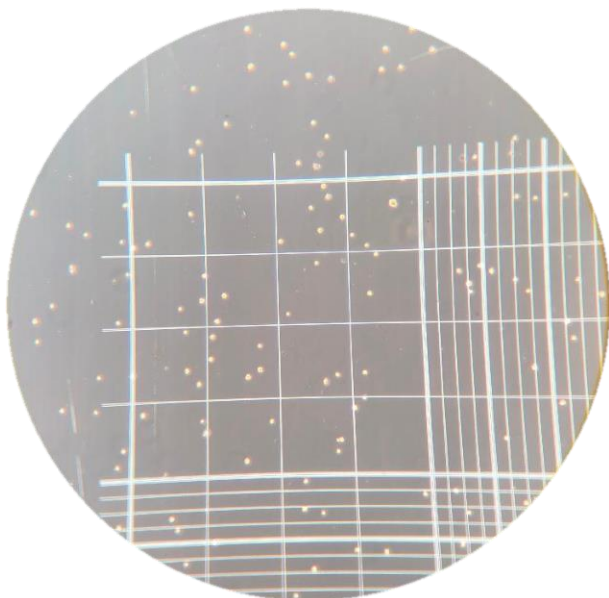


FIGURA 20: Contagem de células viáveis e inviáveis na câmara de Neubauer

EXPOSIÇÃO I

Substância teste	% de viabilidade celular 1	% de viabilidade celular 2
DMSO	88,417	88,994
25	90	91,477
50	95,469	94,304
100	88,018	91,304
DOXO	26,087	19,512

EXPOSIÇÃO II

Substância teste	% de viabilidade celular 1	% de viabilidade celular 2
DMSO	92,593	84,080
25	92,932	93,548
50	91,304	94,770
100	91,239	94,104
DOXO	17,5	17,021

Tabelas 2 E 3: Porcentagem de viabilidade celular nas duas exposições ao Azul de tripan em MRC-5 no tempo de 72h após exposição ao tratamento

Neste ensaio apenas o tratamento com o controle positivo (doxorubicina) reduziu a viabilidade celular em relação ao controle negativo ($p < 0.05$). As soluções de *Libidibia ferrea* L. Não reduziram a viabilidade celular nas diferentes concentrações testadas, como mostrado na figura abaixo.

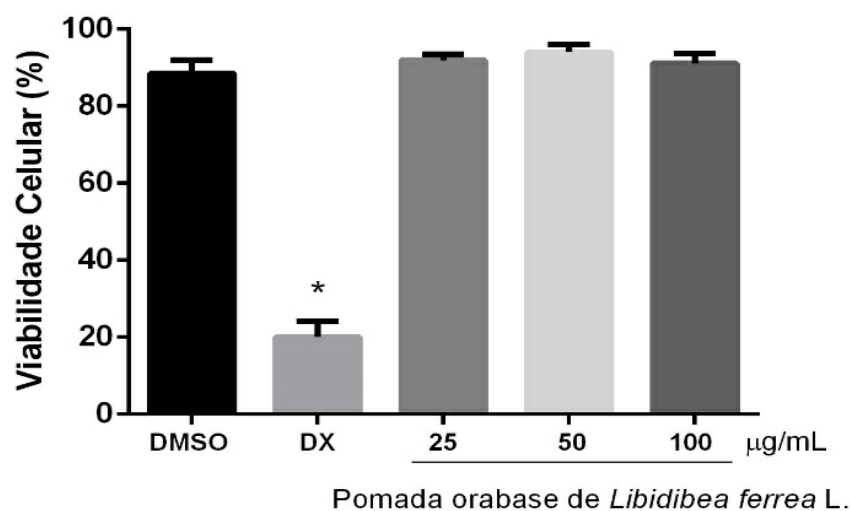


Gráfico 2- Viabilidade de células MRC-5 após o tratamento com a pomada orabase de *Libidibia ferrea* L. no tempo de 72h. DX- Doxorrobicina (10 µg/mL).tratamento de 72h.

5.3 ANÁLISE MORFOLÓGICA EM COLORAÇÃO DIFERENCIAL POR HEMATOXILINA E EOSINA

As alterações morfológicas foram investigadas usando o corante Hematoxilina e Eosina. Na presença das substâncias testes (pomada em orabase 25,50 e 100 $\mu\text{g/mL}$ e DMSO) as células não apresentaram morfologia consistente com apoptose celular. No entanto, no controle positivo (DOXO) alterações como descontinuidade da membrana citoplasmática e fragmentação nuclear foram observadas como evidencia a figura 21.

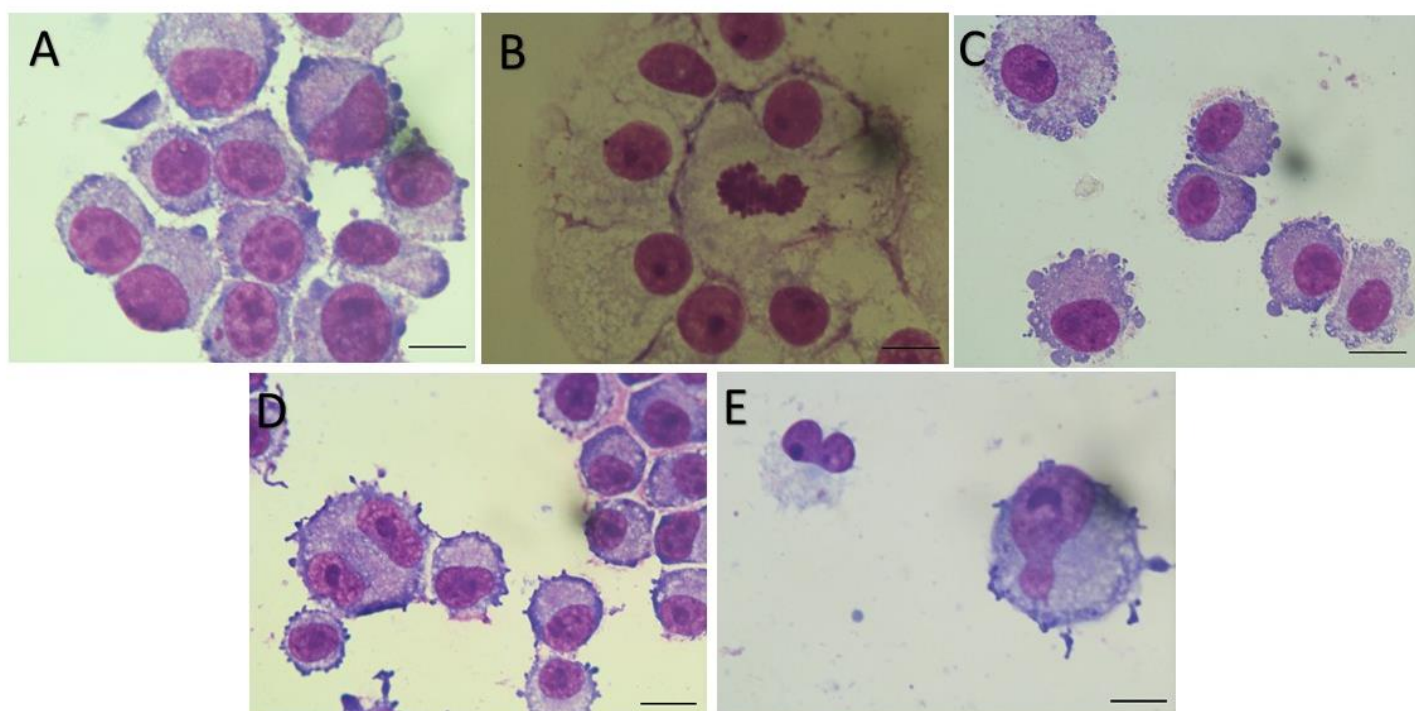


FIGURA 21: Efeito das substâncias teste analisadas em microscópio óptico (40x). (A) MRC-5 tratada com 25 $\mu\text{g/mL}$ de substância teste. (B) MRC-5 tratada com 50 $\mu\text{g/mL}$ de substância teste. (C) MRC-5 tratada com 100 $\mu\text{g/mL}$ de substância teste. (D) MRC-5 tratada com controle negativo. (E) MRC-5 tratada com controle positivo.

5.4 AVALIAÇÃO DA GENOTOXICIDADE *in vitro*

A genotoxicidade foi avaliada através do teste do cometa em célula única em pH alcalino e pH neutro conforme metodologia descrita por SINGH et al. (1988; TICE et al. (2000), WOJEWÓDZKA; BURACZEWSKA; KRUSZEWSKI (2002) com modificações. As substâncias testes nas concentrações 25, 50 e 100 µg/mL foram testados para avaliar a capacidade de causar danos ao DNA, em células não neoplásicas, utilizando a versão em pH alcalino e pH neutro. Para ambos, foi utilizado para a análise comparativa o índice de dano (ID) ao DNA. Tal parâmetro reflete a extensão de DNA lesionado.

CLASSIFICAÇÃO DE DANOS AO DNA

CLASSE 0	Sem cauda (sem danos)
CLASSE 1	Cauda pequena, menor que o diâmetro da cabeça
CLASSE 2	Comprimento da cauda duas vezes maior que o da cabeça
CLASSE 3	Cauda com tamanho superior a duas vezes ao diâmetro da cabeça
CLASSE 4	Cauda longa e espalhada em forma de leque

TABELA 4 : Classificação de danos ao DNA

Em cada lamina foram contabilizados 50 cometas, e eles foram classificados de acordo com o dano ao DNA, que causa a fragmentação do DNA formando a cauda do cometa

O ensaio do cometa alcalino é a versão geralmente mais usada, e capaz de detectar todos os tipos de danos ao DNA (JAYAKUMAR, *et al.*, 2012). Nos resultados obtidos referentes ao cometa alcalino o tratamento com as três concentrações das substâncias testes, controle positivo e controle negativo após 3 h de incubação, não foi observado diferença estatística na migração do DNA em nenhuma concentração testada, ou seja, não induziu danos ao DNA.

No controle negativo feito com DMSO observou-se cometas em graus 0 e 1, em contrapartida no controle positivo observou-se cometas em graus variados a partir do grau 3 como demonstra a figura 23.

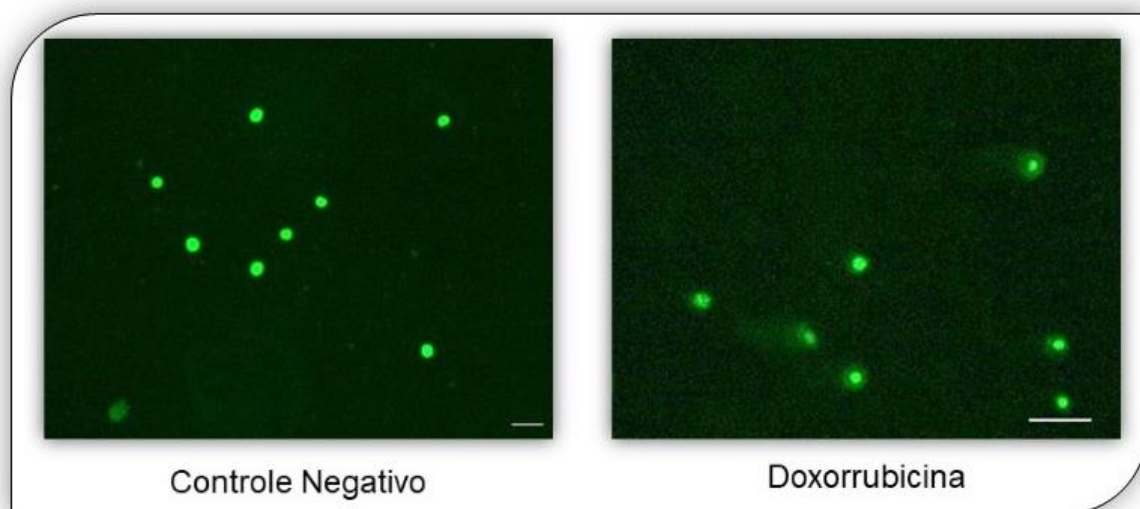


FIGURA 23: Efeito do tratamento da Formulação em orabase de *Libidibia ferrea* L. (Jucá) em fibroblastos na fragmentação do DNA pelo ensaio do cometa em pH alcalino

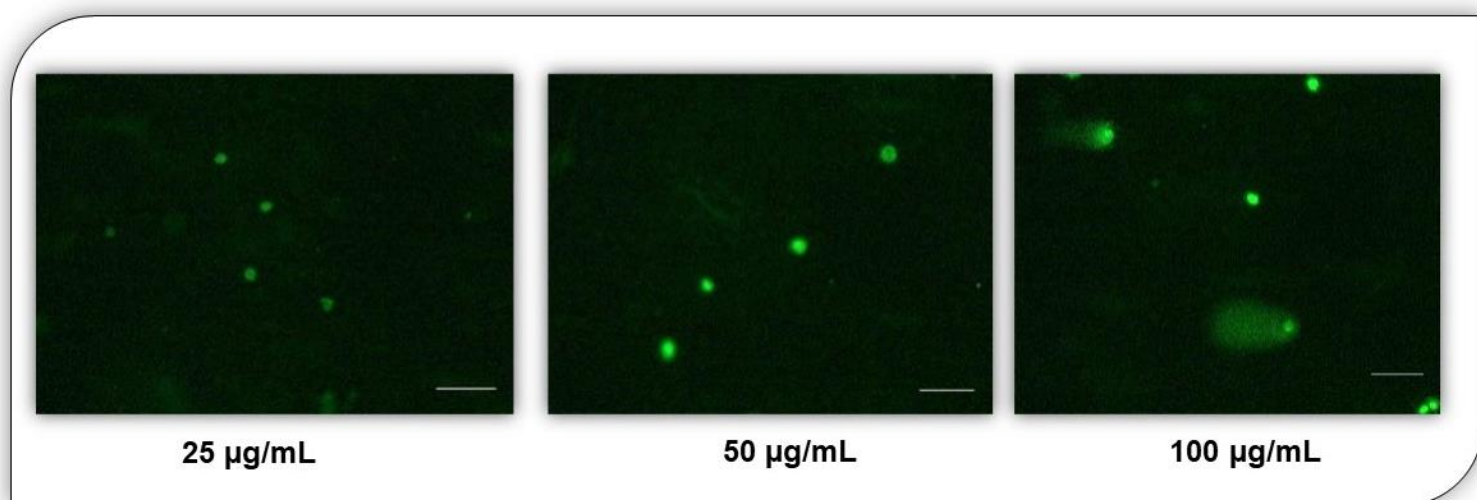


FIGURA 24 : Fotomicrografias do efeito do tratamento da formulação em orabase de *Libidibia ferrea* L. (jucá) em pH alcalino

Quando testado na concentração de 100 $\mu\text{g/mL}$, a mesma foi capaz de induzir dano ao DNA em MRC-5, com índice de dano igual a 58 no cometa em pH alcalino, sendo o tipo de dano mais frequente o de grau 1, como mostra o gráfico a seguir:

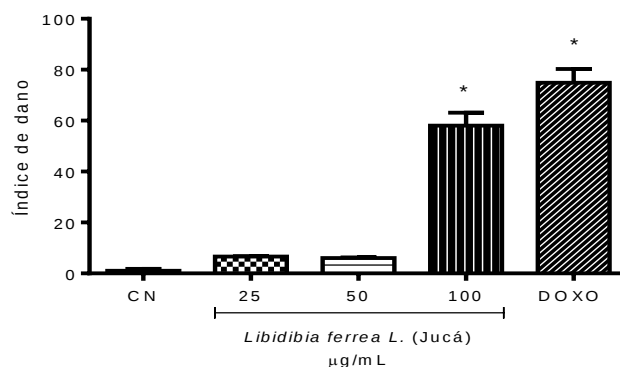


Gráfico 3: Índice de dano ao DNA em células MRC-5, após 3h de tratamento com os em Cometa alcalino. * $p < 0,05$ foi considerado estatisticamente significativo, quando comparado ao DMSO (0,2%) por ANOVA one way seguido de teste Tukey.

Os tipos de dano mais frequentes no ensaio em pH alcalino, após os tratamentos com as substâncias testes, foram os de grau 0 e 1. Quando utilizado doxorubicina (10 $\mu\text{g/mL}$), os danos mais frequentes foi grau 2 e 3.

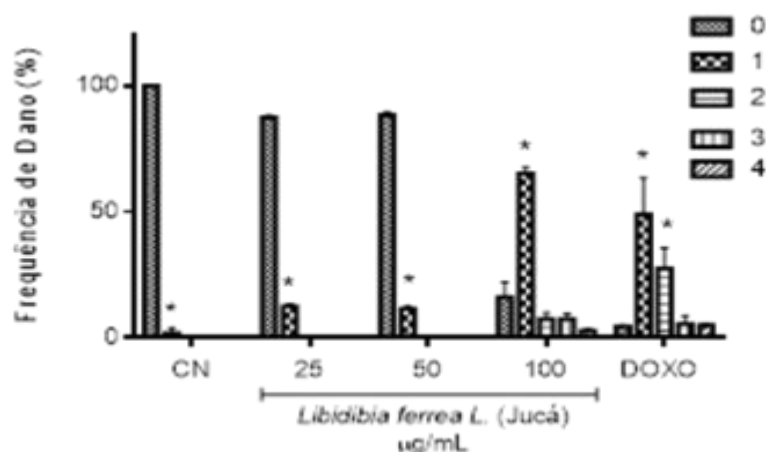


Gráfico 4- CN: Gráfico de frequência de dano em ensaio de cometa alcalino. Controle Negativo DMSO 0,2%; Doxo: Doxorubicina 10 μM . * $p < 0,05$.

O ensaio do cometa em pH neutro permite a detecção de quebras de fitas duplas no DNA (SHARMA, *et al.*, 2011). Os dados estão representados no Gráfico 5. Nessas condições, o tratamento com as substâncias testes, nem na maior concentração testada, causou danos ao DNA, ou seja, não houve diferença estatística significativa em nenhum dos tratamentos quando comparado ao controle. Como demonstram os gráficos e fotomicrografias abaixo:

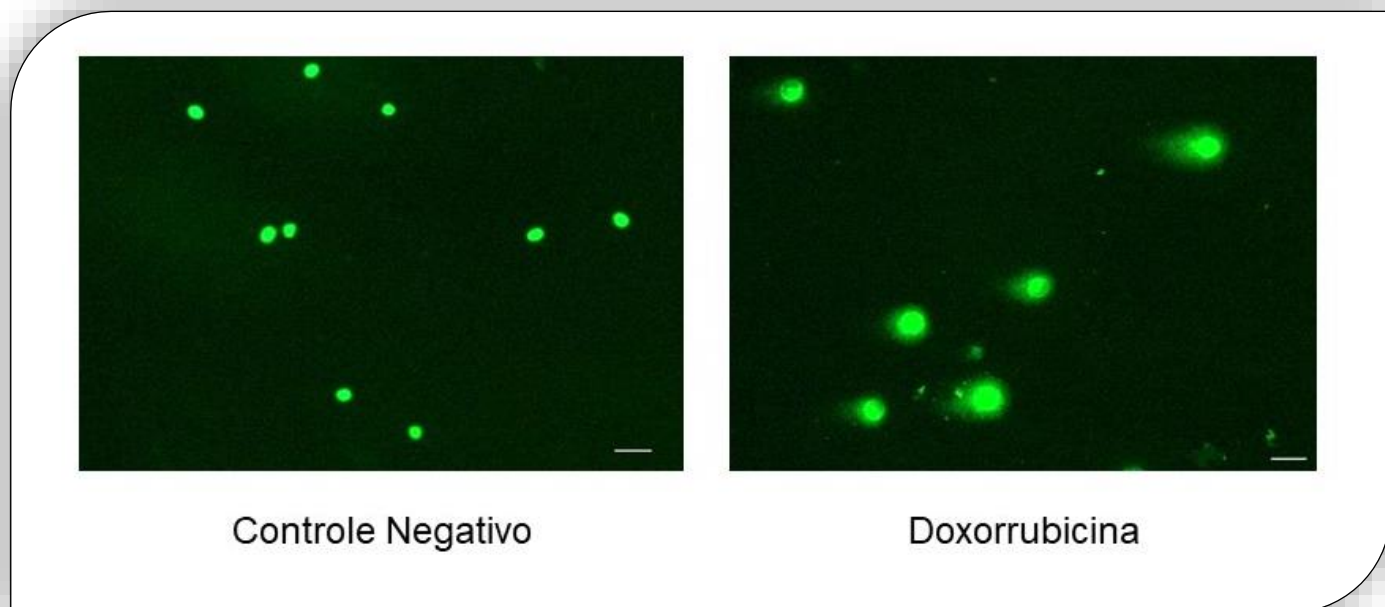


FIGURA 25 : Efeito do tratamento da Formulação em orabase de Libidibia férrea L. (Jucá) em fibroblastos na fragmentação do DNA pelo ensaio do cometa em pH neutro

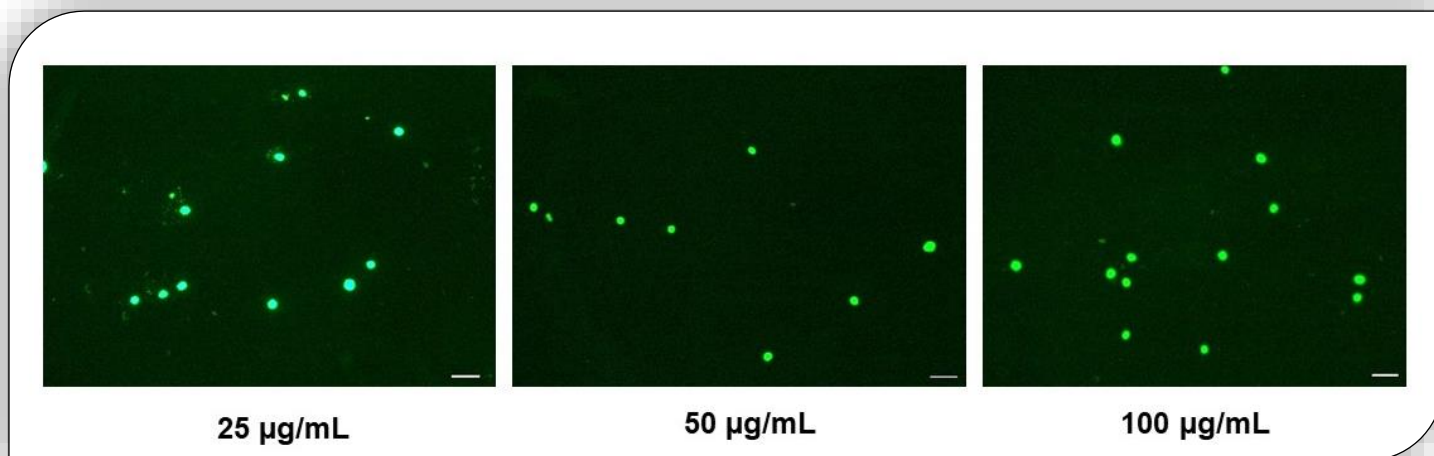


FIGURA 26 : Fotomicrografias do efeito do tratamento da formulação em orabase de Libidibia férrea L. (jucá) em pH neutro

Os gráficos de frequência de dano e de índice de dano confirmam a hipótese de dano por quebra de fita dupla do DNA:

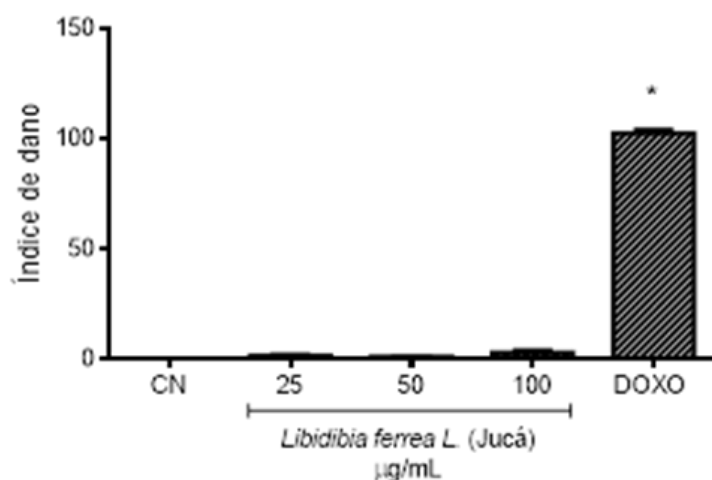


Gráfico 5- Índice de dano do tratamento do Formulação em orabase de *Libidibia ferrea* L. (Jucá) em fibroblastos.

Após os tratamentos, com as substâncias testes, os tipos de dano ao DNA mais frequentes foram os de grau 1 e 2, Doxorubicina (10 $\mu\text{g/mL}$) causou maior frequência de danos grau 2, 3 e 4.

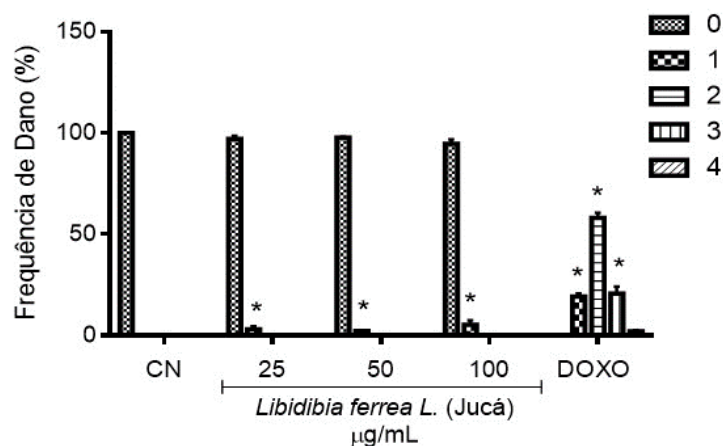


Gráfico 6- : Cometa Neutro : Controle Negativo DMSO 0,2%; Doxo: Doxorubicina 10 μM . * $p < 0,05$.

7. DISCUSSÃO

A medicina popular adotou a fitoterapia como uma prática comum, difundindo um saber que tem sido usado por populações ao longo de vários anos e atingindo muitas gerações, comprovando assim o potencial terapêutico de vários espécimes já usados comumente. E ainda que as plantas medicinais façam parte do cotidiano de pessoas há muitos anos, houve nas últimas décadas um aumento significativo entre pesquisadores e profissionais da área da saúde (IBIAPINA *et al.*, 2014; MACIEL *et al.*, 2002; OLIVEIRA *et al.*, 2006).

Estudos relatam que com a crescente utilização de fitoterápicos na odontologia ratifica-se a necessidade de pesquisas na área afim de avaliar sua segurança e atestar sua eficácia para que sua utilização clínica seja disseminada (GROPPO *et al.*, 2008).

Estudos referentes a inovação tecnológica farmacêuticas aumentaram nas últimas décadas devido à popularidade dos produtos à base de plantas, logo, é de extrema importância novas pesquisas que garantam a eficácia e a segurança dessas formulações. Entretanto, para que uma planta se torne um produto farmacêutico acabado, vários protocolos relacionados à extração do produto; garantia de estabilidade das propriedades farmacológicas; estudos *in vitro*, estudos *in situ* são necessários para que esse produto seja entregue e usado com maior segurança (AKKARI *et al.*, 2016).

Neste sentido, o presente estudo avaliou a citotoxicidade e a genotoxicidade *in vitro* de uma pomada em orabase de *Libidibia ferrea* L. a fim de assegurar seu uso futuro seguro no que se refere a danos celulares e de tecidos.

A genotoxicidade e citotoxicidade de um produto é comumente avaliada por testes *in vitro* de cultura de células ou em organelas celulares (SCHMALZ, 1994) sendo que em Odontologia os testes em culturas de células soam mais comuns. No presente estudo utilizou-se os testes de Alamar Blue, Azul de Tripán e Hematoxilina e Eosina para avaliar os danos causados a fibroblastos humanos (MRC-5).

Com o intuito de testar diferentes concentrações da pomada em orabase, a coloração de Alamar Blue foi utilizada de acordo com a metodologia descrita previamente por Ahmed *et al.* (1994). O Alamar Blue é um indicador fluorescente

que tem propriedades redox (redução-oxidação). A coloração azul indica uma célula não fluorescente e não viável, e a coloração rosa indica uma célula fluorescente, portanto viável.

Outro método utilizado para medir a viabilidade celular foi o Ensaio por exclusão de Azul de Tripán (STROBER, 2001). Neste teste, a coloração ou não da célula é observada para a interpretação do teste. Células viáveis são capazes de expulsar o azul de tripan de seu interior e células não viáveis permanecem azuladas (FERRAZ, 2013).

Complementar a estes dois testes de viabilidade celular descritos, a coloração diferencial por hematoxilina e eosina foi escolhida para testar a viabilidade celular através da análise morfológica frente às substâncias teste, as colorações hematoxilina e eosina coram núcleo e citoplasma de formas diferentes devido a suas propriedades químicas e suas respectivas afinidades. As proteínas possuem afinidade com corante básico (hematoxilina), enquanto o componente do citoplasma tem afinidades por corante ácido (eosina). Através desses corantes conseguimos analisar morfológicamente as alterações causadas nas células pelas substâncias teste (BEDNARCZUK, et al. 2010).

No ensaio *in vitro* de alamar blue a amostra não apresentou citotoxicidade elevada até a maior concentração testada. O valor de CI_{50} é $>50 \mu\text{g/mL}$ na linhagem MRC-5. No teste por azul de tripan, apenas o tratamento com o controle positivo (doxorubicina) reduziu a viabilidade celular em relação ao controle negativo ($p < 0.05$). A amostra não reduziu a viabilidade celular nas concentrações testadas. No teste de alterações morfológicas de Hematoxilina e eosina em todas as concentrações testadas não houve presença significativa de apoptose, redução de volume celular, fragmentação nuclear e formação de corpos apoptóticos.

Em outros estudos do grupo com a própria *Libidibia ferrea* L. já haviam obtido resultados positivos em relação a citotoxicidade. Oliveira et al. (2014) avaliaram a citotoxicidade através do alamar blue, do extrato etanólico a 7,5% da casca do caule do jucá e nenhuma amostra analisada apresentou efeito tóxico quando em contato com as células (MRC-5), ratificando os resultados do presente estudo. O estudo de Oliveira et al (2014) apresentou viabilidade de 81,25% e o presente estudo apresentou de 85,39% de viabilidade celular.

Marreiro et al. (2011) avaliou a citotoxicidade do extrato de *Libidibia ferrea* L. sobre fibroblastos murinos (NIH3T3) cultivados, para a utilização como enxaguatório bucal. Obteve resultados apresentou elevada citotoxicidade tanto para a formulação de enxaguatório de jucá quanto para os constituintes da formulação. Essa citotoxicidade foi atribuída aos constituintes da formulação os quais apresentaram isoladamente ação citotóxica. Sendo assim, concluiu que o extrato deveria ser testado com outros veículos, e que novos testes de citotoxicidade em concentrações diferentes fossem realizados para verificar seu real efeito citotóxico ou não.

No presente estudo em todas as concentrações testadas a pomada de jucá apresentou pouco ou nenhum grau de citotoxicidade tanto nos ensaios com Alamar blue (CI_{50} é $>50 \mu\text{g/mL}$ na linhagem MRC5) ou Azul de tripan (94,1% de viabilidade celular). Quanto ao teste de análise morfológica de hematoxilina e eosina poucas alterações foram encontradas apenas alterações na membrana plasmática, observou-se presença de citoplasma, sem vacuolização, sinalizando assim a viabilidade do uso seguro da formulação testada.

Alterações genotóxicas são ditas as que causam dano ao material genético da célula como quebra de fita simples ou dupla, lesão cromossomal, e outras. O ensaio do cometa é um teste de genotoxicidade, logo, afere a fragmentação do núcleo através da movimentação do DNA, formando a cauda quando o material genético é submetido a uma corrente elétrica em solução alcalina ou neutra (SAMPAIO et al. 2012)

A genotoxicidade foi avaliada através do teste do cometa em célula única em pH alcalino e pH neutro conforme metodologia descrita por SINGH et al. (1988; TICE et al. (2000), WOJEWÓDZKA; BURACZEWSKA; KRUSZEWSKI (2002) com modificações. As células de fibroblasto humano (MRC5) foram tratadas por 3 horas com a formulação em orabase de *Libidibia ferrea* L. (Jucá) nas concentrações de 25, 50 e 100 $\mu\text{g/mL}$, controle negativo DMSO 0,2% e controle positivo Doxorrubicina 10 μM .

Nos estudos de genotoxicidade as duas primeiras concentrações testadas de 25 e de 50 $\mu\text{g/mL}$ não foram capazes de induzir dano ao DNA, tanto em cometa alcalino quanto no neutro mostrando-se dose dependente. Na concentração de 100 $\mu\text{g/mL}$ houve danos, porém apenas de grau 1.

Souza et al. (2016) avaliaram a genotoxicidade da emulsão à base de óleo de copaíba como coadjuvante na adesão dentinária frente à fibroblastos humanos (MRC5). Obtiveram resultados positivos, onde somente a clorexidina a 2% na concentração de 50µL/mL e a doxorrubicina (controle positivo) foram estatisticamente genotóxicas, ou seja, apresentaram dano ao DNA celular comparado com o controle negativo (DMSO). O óleo de copaíba, emulsão de copaíba nas concentrações 25, 50, 75µL/mL e o veículo não apresentaram diferença significativa dos seus resultados em relação ao controle negativo (DMSO).

Na mesma linha de resultados Cavalcanti et al. (2006), avaliaram o potencial genotóxico do ácido caurenóico presente no óleo de copaíba frente a fibroblastos (V79) utilizando teste do cometa, obtiveram o resultado positivo que nas três concentrações testadas (2,5; 5 e 10 µg/mL) não houve dano significativo ao DNA da célula, todavia, a exposição a altas concentrações de ácido caurenóico (30 e 60 µg/mL) foram observadas aumentos significativos no índice de danos no DNA celular, ratificando que alguns danos ao DNA são dose dependentes.

Estes e outros resultados encontrados pelo grupo de pesquisa em fitoterapia da Faculdade de Odontologia da UFAM e por outros achados científicos sejam com óleo de copaíba, enxaguatório bucal de *Libidibia ferrea* L. ou agora no presente estudo com a formulação em pomada em orabase de Jucá, ratificam os achados científicos de que a *Libidibia ferrea* L., não fornece riscos citotóxicos ou genotóxicos à célula, podendo ser utilizada de modo terapêutico, fortalecendo, assim, a proposta de um poderoso cicatrizante, e uma alternativa mais acessível na odontologia.

8. CONCLUSÃO

De acordo com os resultados obtidos, a formulação em orabase de *Libidibia ferrea* L.:

- Não apresentou citotoxicidade elevada até a maior concentração testada, com média percentual de 81,25% de viabilidade celular.
- As células testadas não apresentaram morfologia consistente com apoptose celular.
- Não foi capaz de induzir dano ao DNA em células de fibroblasto humano (MRC-5) nas concentrações de 25 e 50 µg/mL tanto em ensaio do cometa em pH alcalino quanto em pH neutro.
- Quando testada na concentração de 100 µg/mL foi capaz de induzir dano ao DNA em MRC-5, porém sem diferença estatística significativa

Assim, a formulação em orabase de *Libidibia ferrea* L. não foi considerada citotóxica e genotóxica. Outros ensaios biológicos podem ser feitos in vivo agora para identificar se a pomada ou seus componentes podem causar atividade tóxica à célula, ou ainda estudos posteriores poderão afirmar se o dano induzido na concentração de 100 µg/mL nas células MRC-5 é reversível ou não de maneira que possa se assegurar a segurança do seu uso.

9. REFERÊNCIAS

AGRA, M.F.; FREITAS, P.F.; BARBOSA-FILHO, J.M. Synopsis of the plants known as medicinal and poisonous in Northeast of Brazil. Rev. Bras. Farmacogn., v.17, n.1, p.114-40, 2007.

AHMED, S.A. et al. A new rapid and simple non-radioactive assay to monitor and determine the proliferation of lymphocytes: an alternative to [3H]thymidine incorporation assay. Journal of Immunological Methods, v. 170, p. 211-224, 1994.

ALTENBURG, A.; EL-HAJ, N.; MICHELI, C., PUTTKAMMER, M., ABDEL-NASER, M.; ZOUBOULIS, C. C. The Treatment of Chronic Recurrent Oral Aphthous Ulcers. Deutsches Aerzteblatt Online, v. 111, n. 40, p. 665-673, 2014.

AKKARI, ACS. Inovação tecnológica na indústria farmacêutica diferenças entre Europa, os EUA e os países emergentes, Gest. Prod. Vol 23, número 2, São Carlos, SP, 2016.

ANVISA. Guia para Avaliação de Segurança de Produtos Cosméticos. Brasília: [s.n.], 2003.

AVILA-CAMPOS MJ, VELASQUEZ-MELÉNDEZ G. Prevalence of putative periodontopathogens from periodontal patients and healthy subjects in São Paulo, SP, Brazil. Rev Inst Med Trop São Paulo. 2009;44(1):1-5.

Azqueta A, Collins AR. Carotenoids and DNA damage. Mutat Res. 1;733(1-2):4-13. 2012.

BALBACH A. As Plantas que Curam. 2 ed. São Paulo: Editora Missionária, 1992.

BARAKAT, L. Avaliação da viabilidade de obtenção de formas farmacêuticas plásticas contendo extrato seco de *Caesalpinia ferrea* Mart. 2011. 100f.

Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas), Universidade Federal do Amazonas, Manaus.

BATISTA NCS, BERNARDES J, MENEGON VSM. Conversas no cotidiano: um dedo de prosa na pesquisa. In: Spink MJP (Ed.). A produção de informação na pesquisa social: compartilhando ferramentas [Internet]. 2014[cited 2015 Jun 10]:[26p.]. Available from: https://www.researchgate.net/publication/267328698_A_PRODUCAO_DE_INFORMACAO_NA_PESQUISA_SOCIAL_compartilhando_ferramentas

BEDNARCZUK, V. O. et al. Testes in vitro e in vivo utilizados na triagem toxicológica de produtos naturais. *Visão Acadêmica*, v.11, n.2, p.44, 2010.

BELENGUER-GUALLAR,I. Treatment of recurrent aphtous stomatitis. A literature review. *J clin Exp dente* ;6(2):e168-74. 2014

BERKOWITZ SA, ENGEN JR, MAZZEO JR, JONES GB. Analytical tools for characterizing biopharmaceuticals and the implications for biosimilars. *Natl Rev*. 2012;11(7):527-40. PMID:22743980

BORRÁS, M.R.L. Plantas da Amazônia: Medicinais ou mágica? – Plantas comercializadas no mercado Adolpho Lisboa. Manaus: Valer/Governo do Estado do Amazonas, 2003. 322 p.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Políticas de Saúde. Departamento de Atenção Básica. Área Técnica de Dermatologia Sanitária. Manual de Condutas para Úlcera Neutróficas e Traumáticas. Brasília. 2.ed., 2002. 55p.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) Resolução de Diretoria Colegiada no. 48 de 16 de março de 2004. Aprova o regulamento técnico de medicamentos fitoterápico junto ao Sistema Nacional de Vigilância Sanitária. DOU. Diário Oficial da União, Poder Executivo, DF, Brasília, 18 mar. 2004.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). Resolução RDC n 48 de 18 mar. 2004. Diário Oficial da República Federativa do Brasil. Dispõe sobre o registro dos medicamentos fitoterápicos. Brasília. Disponível em: <<http://www.anvisa.gov.br/e-legis/>>.

CARVALHO JCT et al. Preliminary studies of analgesic and anti-inflammatory properties of *Caesalpinia ferrea* crude extract. J Ethnopharm. 53: 175-8. 1996.

CASSAMASSIMO, P. S.; FLAITS, C. M.; HAMMERSMITH, K.; SANGVAI, S.; KUMAR, A. Recognizing the Relationship Between Disorders in the Oral Cavity and Systemic Disease. Pediatric Clinics of North America, v. 65, n.5, p. 1007–1032, 2018.

CONDE, N.C.O. Avaliação da atividade antimicrobiana de plantas da Amazônia sobre bactérias do biofilme dental. 2006. Tese (Doutorado em Estomatologia), Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa.

CARVALHO, J.C.T. et al. Preliminary studies of analgesic and anti-inflammatory properties of *Caesalpinia ferrea* crude extract. J. Ethnopharmacol., v. 53, n. 3, p. 117-85, 1996.

CARVALHO, J.C.T. Fitoterápicos anti-inflamatórios: aspectos químicos, farmacológicos e aplicações terapêuticas. Ribeirão Preto: Tecmedd, 2004. 479 p.

CARVALHO, M. B. et al. Neoplasias do Sistema Urinário. In: DALECK, C. R.; NARDI, A. B. D. Oncologia. 2. ed. Rio de Janeiro: Roca, 2016. Cap. 37, p. 461-477.

CAVALHER-MACHADO S, ROSAS E, BRITO F, HERINGE A, OLIVEIRA R, KAPLAN M, et al. The anti-allergic activity of the acetate fraction of *Schinus terebinthifolius* leaves in IgE induced mice paw edema and pleurisy. International Immunopharmacology. 2008;8(11):1552-60

COSSEAU, C.; DEVINE D.A.; DULLAGHAN, E.; GARDY J.L.; CHIKATAMARLA, A.; GELLATLY, S. et al. The commensal *Streptococcus salivarius* K12 downregulates the innate immune responses of human epithelial cells and promotes host-microbe homeostasis. *Infect. Immun.*, v. 76, p. 4163- 75, 2008.

COUTINHO, M. A. S.; MUZITANO, M. F.; COSTA, S. S. Flavonóides: Potenciais agentes terapêuticos para o processo inflamatório, *Revista Virtual Quim.*, v.1, n. 3, p. 241-256, 2009.

CURTIS, M.A.; SLANEY, J.M.; ADUSE-OPOKU, J. Critical pathways in microbial virulence. *J. Clin. Periodontol.*, v.32 (suppl. 6), p.28-38, 2005.

EDGAR, N. R. et al. (2017). Recurrent Aphthous Stomatitis: A Review. *The Journal of Clinical and Aesthetic Dermatology*, 10(3), pp.26–36.

EVANGELISTA SS, SAMPAIO FC, PARENTE RC, BANDEIRA MFCL. Fitoterápicos na Odontologia: Estudo etnobotânico na cidade de Manaus. *Rev Bras Pl Med* 2013. 15(4): 513-9.

EVANS GO. *Animal Hematotoxicology: a partial guide for toxicologists and biomedical researchers*. [S.I.]: CRC, 2009.

FERRAZ, S. et al. Manejo Sustentável de Fitonematoides. Viçosa, MG: UFV, 2012. 304 p.

FOSCHI, F. et al. *Treponema denticola* in disseminating endodontic infections. *J. Dent. Res.*, v. 85, n. 8, p. 761-765, 2006

FIELDS RD and Lancaster MV (1993) Dual-attribute continuous monitoring of cell proliferation/cytotoxicity. *Am Biotechnol Lab* 11,48– 50.

FISCHER, D. et al. *In vitro* cytotoxicity testing of polycations: influence of polymer structure on cell viability and hemolysis. *Biomaterials*, v. 24, p. 1121 – 1131, 2003.

FRANCISCO, K.S.F. Fitoterapia: Uma opção para o tratamento odontológico. Revista Saúde, v. 4, n.1, p. 18-24, 2010.

FRESHNEY, R.I. Culture of animal cells: a manual of basic techniques. 4. ed. New York: Wiley – Liss, 2000. 577p

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

GUIDO, R. V. C. et al. Virtual screening and its integration with modern drug design technologies. *Curr. Med. Chem.*, v.15, n.1, p.37-46, 2008a

HAMEDI, S.; ARIAN, A.A.; FARZAEI, M.H. Gastroprotective effect of aqueous stem bark extract of *Ziziphus jujuba* L. against HCl/Ethanol-induced gastric mucosal injury in rats. *J Tradit Chin Med.* v. 35(6), p. 666-70, 2016

IBIAPINA, W.V. et.al. Inserção da Fitoterapia na Atenção Primária aos Usuários do SUS. *Rev. Ciênc. Saúde Nova Esperança.* Jun. 2014. Disponível em . Acesso em 05 jan 2018.

KUMARAVEL, T.S.; JHA, A.N. Reliable Comet assay measurements for detecting DNA damage induced by ionising radiation and chemicals. **Mutation Research**, v. 605, p. 7rchJHA, A.

LILJEMARK, W.F.; BLOOMQUIST, C.G. Flora microbiana normal do corpo humano. In: NISENGARD, R.J.; NEWMAN, M.G. *Microbiologia Oral e Imunologia*. 2. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1997. p. 102-109.

Maciel, M.A.M.; Pinto, A.C. & Veiga, V.E. 2002. Plantas medicinais: a necessidade de estudos multidisciplinares. *Química Nova* 23: 429-438. Maioli-Azevedo, V. & Fonseca-Kruel, V.S. 2007. Plantas medicinais e ritualísticas vendidas em feiras livres no Município do Rio de Janeiro, RJ, Brasil: estudo de caso nas zonas Norte e Sul. *Acta Botanica Brasilica* 21: 263-275.

MASSON, AO; NASCIMENTO, MHM; LOMBELLO, CB. Análise comparativa de diferentes métodos de citotoxicidade in vitro. In: XXIV Congresso Brasileiro de Engenharia Biomédica, Uberlândia, MG, 2014. Anais...p.2484-2488. Ref.723. Disponível em: http://www.canal6.com.br/cbeb/2014/artigos/cbeb2014_submissao_723.pdf. Acesso em: 13 de julho de 2017

MARREIRO RO, BANDEIRA MFCL, CONDE NCO, SOUSA TP. Obtenção de um extrato etanólico de *Caesalpinia ferrea* L. e avaliação da estabilidade microbiológica e atividade antimicrobiana para formulação de um enxaguatório bucal. Relatório final de PIBIC/FAPEAM/UFAM. 2008. 56p.

MARREIRO RO. *Caesalpinia ferrea* L: Avaliação da atividade antimicrobiana, controle de qualidade e citotoxicidade de uma formulação comercial de enxaguatório bucal. Dissertação apresentada ao Programa de pós-graduação em Saúde, Sociedade e Endemias na Amazônia/FIOCRUZ, 2011.

MARREIRO RO et al. Evaluation of the stability and antimicrobial activity of an ethanolic extract of *Libidibia ferrea*. Clinical, Cosmetic and Investigational Dentistry 2014. 6: 1-5.

MATOS, A.J.P. "Controle de qualidade físico-químico de uma formulação de pomada orabase de *Libidibia ferrea* ex. *Caesalpinia ferrea* L". 2016. 63 folhas. Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Odontologia, da Universidade Federal do Amazonas, Manaus-AM, 2016

MARTORELLI S, Pinheiro A, Souza I, Higino J, Bravo F. Efeito antiinflamatório e cicatrizante do extrato hidroalcoólico de *Schinus terebinthifolius* Raddi (AROEIRA) a 30% em orabase- estudo in vivo. IJD International Journal of Dentistry. 2011;10(02):80-90

NEVILLE, B.; DAMM, D.D.; ALLEN, C.M.; BOUQUOT, J.J. Patologia Oral & Maxilofacial. 3. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2016.

NÓBREGA, A.M. et al. Avaliação da irritabilidade ocular induzida por ingredientes de cosméticos através do teste de Draize e dos Métodos HET-CAM e RBC. *Universitas: Ciências da Saúde*, v. 6, p. 103-120, 2008.

NOZAKI, H., et al. Pauferrol A, a novel chalcone trimer with a cyclobutane ring from *Caesalpinia ferrea* Mart exhibiting DNA topoisomerase II inhibition and apoptosis-inducing activity. *Tetrahedron Letters*, v. 48, p. 8290–8292, 2007

OLIVEIRA, A.F. et al. Avaliação da atividade cicatrizante do jucá (*Caesalpinia ferrea* Mart. ex Tul. var. *ferrea*) em lesões cutâneas de caprinos. *Revista Brasileira de Plantas Mediciniais*, Botucatu, v. 12, n. 3, p. 302-310, 2010.

OLIVEIRA, Andréia Freitas de Oliveira. Avaliação da atividade cicatrizante da *Caesalpinia ferrea* (tul.) Martius (jucá) em lesões cutâneas de caprinos. 2008a. 65f. Dissertação (Mestrado em Ciência Animal) - Universidade Federal Rural do Semi-Árido – UFERSA, Mossoró – RN.

OLIVEIRA, F.P., et al.. Espécies vegetais indicadas na odontologia. *Rev. bras. Farmacogn.*, João Pessoa, v. 17, n. 3, 2007.

OLIVE, P. L.; BANATH, J. P. Sizing highly fragmented DNA in individual apoptotic cells using the comet assay and a DNA crosslinking agent. *Experimental Cell Research*, v. 221, p. 19-26, 1995.

PROTOPOPOVA, M. et al. Identification of a new antitubercular drug candidate, SQ 109, from a combinatorial library of 1,2-ethylenediamines. *J Antimicrob Chemother.*, v. 56, p. 968-974, 2005.

ROSENBAUER, K.; ENGELHARDT, J.; KOCH, H.; STUTTGEN, U.; Anatomia clínica de cabeça e pescoço aplicada à odontologia. 2.ed. Rio de Janeiro: Artmed, 2001.

SAMPAIO, F.C.; PEREIRA, M.S.V.; DIAS, C.S.; COSTA, V.C.O.; CONDE, N.C.O.; BUZALAF, M.A.R. *In vitro* antimicrobial activity of *Caesalpinia ferrea*

Martius fruits against oral pathogens. *Journal of Ethnopharmacology*, v. 124, p. 289–294, 2009.

Santos EB, Dantas GS, Santos HB, Diniz MFFM, Sampaio FC. Estudo etnobotânico de plantas medicinais para problemas bucais no município de João Pessoa, Brasil. *Rev. bras. farmacogn.* 2009;19(1B):321-4

SENNE, M. I. et al. Avaliação da citotoxicidade dos três cimentos endodônticos empregados na obturação do sistema de canais radiculares. *Revista Sul-Brasileira de Odontologia*, v. 6, n.1, 2009.

SOARES, D. G. D. S.; OLIVEIRA, C. B.; LEAL, C.; DRUMOND, M. R. S.; PADILHA, W. W. N. Atividade antibacteriana in vitro da tintura de aroeira (*Schinus terebinthifolius*) na descontaminação de escovas dentais contaminadas pelo *S. mutans*. **Pesquisa Brasileira em Odontopediatria e Clínica Integrada**, v. 7, p. 253-7, 2013.

SOUZA, N.J.A. Cytotoxicity of materials used in perforation repair tested using the V79 fibroblast cell line and the granulocyte-macrophage progenitor cells. *Int Endod J*, v. 39, n. 1, p. 40–7, 2006.

SOYAMA, P. Plantas medicinais são pouco exploradas pelos dentistas. *Cienc. Cult.* v. 59, n. 1, p. 12-3, 2007.

STOBER, W.R. The role of natural products in a modern drug discovery program. *Drug Discovery Today*. v. 5, n. 2, p. 29- 41, 2000.

TEIXEIRA, M.F.S. et al. Fungos da Amazônia: uma riqueza inexplorada (aplicações biotecnológicas). 1. ed. Manaus: FUA, 2011. 229 p.

TICE, R.R.; AGURELL, E.; ANERSON, B.; BURLINSON, B.; HARTMANN, A.; KOBAYASHI, H.; MIYAMAE, Y.; ROJAS, E.; RYU, J.C.; SASAKI, Y.F. Single cell

gel/comet assay: guidelines for in vitro and in vivo genetic toxicology testing. *Environmental and Molecular Mutagenesis*, v. 35, p. 206-21, 2000

VALENTE D, COSTA-AMARAL IC, CARVALHO LVB, SANTOS MVC, CASTRO VS, RODRIGUES DRF, et al. Utilização de biomarcadores de genotoxicidade e expressão gênica na avaliação de trabalhadores de postos de combustíveis expostos a vapores de gasolina. *Rev Bras Saúde Ocup* [online]. 2017;42(Suppl 1):e2s.

VASCONCELLOS, M. C.; BEZERRA, D. P.; FONSECA, A. M.; PEREIRA, M. R. P.; LEMOS, T. L. G.; PESSOA, O. D. L.; PESSOA, C.; MORAES, M. O.; ALVES, A. P. N. N.; COSTA-LOTUFO, L. V. Antitumor activity of biflorin, an o-naphthoquinone isolated from *Capraria biflora*. *Biological and Pharmaceutical Bulletin*, v. 30, p. 1416-1421, 2007.

VASCONCELLOS, M. C.; BEZERRA, D. P.; FONSECA, A. M.; ARAÚJO, A. J.; PESSOA, C.; LEMOS, T.L.G.; COSTA-LOTUFO, L. V.; MORAES, M. O.; MONTENEGRO, R. C. 2011. The in-vitro and in-vivo inhibitory activity of biflorin in melanoma. *Melanoma Research*, v. 21, p. 106–114

VENÂNCIO, G.N. et al. Hebal mouthwash based on *Libidibia ferrea*: microbiological control, sensory characteristics, sedimentation, pH and density. *Rev. Odontol. UNESP*, Mar- Apr:44 (2): 118-124 . 2015.

WRIGHT, J. M. (1985). Manifestações bucais das reações das drogas. *Clínicas Odontológicas da América do Norte. Farmacoterapia*, 149-164. Cap.10. São Paulo, SP: Roca.

WOJEWODZKA, M.; BURACZEWSKA, I.; KRUSZEWSKI, M. A modified neutral comet assay: elimination of lysis at high temperature and validation of the assay with anti-single stranded DNA antibody. **Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis**, v. 518, p. 9-20, 2002.

Zhang TT., Tang SS, & Fu LJ. The effectiveness of different concentrations of chlorhexidine for prevention of ventilator-associated pneumonia: a meta-analysis. *Journal of Clinical Nursing*, v.23, p.1461-1475, 2014. doi: 10.1111/jocn.12312.