



UNIVERSIDADE ESTADUAL DO CEARÁ
FACULDADE DE VETERINÁRIA
MESTRADO PROFISSIONAL EM BIOTECNOLOGIA EM SAÚDE HUMANA E
ANIMAL

ALEXANDRA VIEIRA DE MENEZES

USO DE PASTILHAS MASTIGÁVEIS CONTENDO *Punica granatum* Linné
SOBRE A MICROBIOTA ORAL DE PACIENTES ORTODÔNTICOS:
ESTUDO TRANSVERSAL PILOTO

FORTALEZA – CEARÁ
2024

ALEXANDRA VIEIRA DE MENEZES

USO DE PASTILHAS MASTIGÁVEIS CONTENDO *Punica granatum* Linné SOBRE
A MICROBIOTA ORAL DE PACIENTES ORTODÔNTICOS: ESTUDO
TRANSVERSAL PILOTO

Dissertação apresentada ao Curso de Mestrado Profissional em Biotecnologia em Saúde Humana e Animal da Faculdade de Veterinária da Universidade Estadual do Ceará, como requisito parcial à obtenção do título de mestre em Biotecnologia.

Orientadora: Prof.^a Dr.^a Cristiane Clemente de Mello Salgueiro.

Coorientador: Prof. Dr. Edilson Martins Rodrigues Neto.

FORTALEZA – CEARÁ

2024

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
Universidade Estadual do Ceará
Sistema de Bibliotecas
Gerada automaticamente pelo SidUECE, mediante os dados fornecidos pelo(a)

Menezes, Alexandra Vieira de.

Uso de pastilhas mastigáveis contendo punica granatum linné sobre a microbiota oral de pacientes ortodônticos: estudo transversal piloto [recurso eletrônico] / Alexandra Vieira de Menezes. - 2024.

52 f. : il.

Dissertação (mestrado profissional) - Universidade Estadual do Ceará, Faculdade de Veterinária, Curso de Mestrado Profissional - Programa de Pós-graduação Em Biotecnologia Em Saúde Humana E Animal, Fortaleza, 2024.

Orientação: Prof.^a Dra. Cristiane Clemente de Mello Salgueiro.

Coorientação: Prof. Dr. Edilson Martins Rodrigues Neto.

1. Cárie dentária. 2. Pastilha mastigável. 3. Romã. 4. Microrganismos orais. I. Título.

ALEXANDRA VIEIRA DE MENEZES

USO DE PASTILHAS MASTIGÁVEIS CONTENDO *Punica granatum* Linné SOBRE
A MICROBIOTA ORAL DE PACIENTES ORTODÔNTICOS: ESTUDO
TRANSVERSAL PILOTO

Dissertação apresentada ao Curso de Mestrado Profissional em Biotecnologia em Saúde Humana e Animal da Faculdade de Veterinária da Universidade Estadual do Ceará, como requisito parcial à obtenção do título de mestre em Biotecnologia.

Aprovada em: 28 de março de 2024.

BANCA EXAMINADORA

Prof.^a Dr.^a Cristiane Clemente de Mello Salgueiro (Orientadora)
Centro Universitário Inta – UNINTA

Prof. Dr. Edilson Martins Rodrigues Neto (Coorientador)
Universidade Federal do Ceará – UFC

Prof.^a Dr.^a Thayanne Brasil Barbosa Calcia
Faculdade de Medicina de Petrópolis

A Deus,
À minha família, razão do meu viver.

AGRADECIMENTOS

A DEUS, por todas as oportunidades concedidas a mim e pela permissão que fez com que meus objetivos fossem alcançados.

Ao meu marido, Frederico Helder, cujo apoio foi essencial em todo o processo e por fornecer todas as condições para que eu concluísse o mestrado. Obrigada por todo amor e cuidado.

Às minhas filhas, Juliana Vieira e Júlia Vieira, pelo amor e incentivo em todos os momentos dessa caminhada. Vocês são a luz da minha vida.

Aos meus pais, Antônio Vieira e Maria das Graças e ao meu irmão Alexandre Vieira, por todo apoio e carinho ao longo da vida.

Ao meu coorientador, Prof. Dr. Edilson Martins Rodrigues Neto, sou extremamente grata por ter desempenhado essa função com dedicação, amizade, paciência e incentivo durante todo o desenvolvimento desse trabalho, sem o qual eu não teria concluído essa dissertação. Obrigada por partilhar seu vasto conhecimento.

À minha orientadora Prof.^a Dra. Cristiane Clemente de Mello Salgueiro, pelas correções e contribuições assertivas na conclusão desse trabalho.

Finalmente, agradeço a todos que direta ou indiretamente fizeram parte desse processo.

“Todo o trabalho é vazio a não ser que haja amor”.

(Khalil Gibran)

RESUMO

A cárie dentária é uma condição patológica crônica açúcar-dependente modulada por múltiplos fatores e associada a uma disbiose da cavidade oral. Ela se caracteriza por uma desregulação no processo des/remineralização da matriz dentária, podendo ocorrer em esmalte e/ou dentina, por meio da produção de ácidos pelos microrganismos presentes no biofilme dentário, como *Streptococcus mutans*. Microrganismos gram-negativos (MOGN) como *Porphyromonas gingivalis*, *Tannerella forsythensis*, *Treponema denticola*, *Prevotella intermedia*, *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* estão intimamente ligados com o processo de gengivite e doença periodontal, sendo encontrados no biofilme presente nas bolsas periodontais. Nesse contexto, a *Punica granatum* Linné (romã) se apresenta como uma alternativa natural para auxiliar no controle de microrganismos orais envolvidos nos processos e a forma farmacêutica de pastilha mastigável se torna uma alternativa para sua veiculação. Esse estudo buscou avaliar uma pastilha mastigável à base de *Punica granatum* Linné 6,25% na redução de microrganismos orais em amostras de saliva estimulada de voluntários adultos que fazem uso de aparelho ortodôntico. Trata-se de um ensaio clínico, randomizado, sendo um estudo piloto transversal. Foram selecionados para participar do estudo 12 voluntários. Em relação aos MOGN, houve redução de 1.20 (0.24) UFC/mL.log¹⁰ (P=0,004408) no grupo teste; enquanto no placebo, aumento de 0.09 (0.11) UFC/mL.log¹⁰. No caso dos *S. mutans*, 0.44 (0.41) UFC/mL.log¹⁰ (P=0,002165), e aumento de 0.08 (0.19) UFC/mL.log¹⁰ no placebo. Pelo exposto observou-se que as pastilhas mastigáveis contendo *Punica granatum* Linné 6,25% foram capazes de reduzir a carga de *S. mutans* e microrganismos gram-negativos salivares. A pastilha mastigável demonstrou segurança pelo fato de nenhum participante apresentar efeitos adversos. Esse ensaio clínico piloto apresentou resultados promissores; entretanto, novos estudos devem ser realizados com um maior tempo de acompanhamento e maior população.

Palavras-chave: Cárie dentária; Pastilha mastigável; Romã; Microrganismos orais.

ABSTRACT

Dental caries is a chronic sugar-dependent pathological condition modulated by multiple factors and associated with dysbiosis of the oral cavity. It is characterized by a deregulation in the de/remineralization process of the dental matrix, which can occur in enamel and/or dentin, through the production of acids by microorganisms present in the dental biofilm, such as *Streptococcus mutans*. Gram-negative microorganisms (MOGN) such as *Porphyromonas gingivalis*, *Tannerella forsythensis*, *Treponema denticola*, *Prevotella intermedia*, *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* are closely linked to the process of gingivitis and periodontal disease, being found in the biofilm present in periodontal pockets. In this context, *Punica granatum* Linné (pomegranate) presents itself as a natural alternative to help control oral microorganisms involved in the processes and the chewable tablet pharmaceutical form becomes an alternative for its delivery. This study sought to evaluate a chewable tablet based on *Punica granatum* Linné 6.25% in reducing oral microorganisms in stimulated saliva samples from adult volunteers who use orthodontic braces. This is a randomized clinical trial, cross-sectional pilot study. Twelve volunteers were selected to participate in the study. In relation to MOGN, there was a reduction of 1.20 (0.24) CFU/mL.log¹⁰ (P=0.004408) in the test group; while on placebo, an increase of 0.09 (0.11) CFU/mL.log¹⁰. In the case of *S. mutans*, 0.44 (0.41) CFU/mL.log¹⁰ (P=0.002165), and an increase of 0.08 (0.19) CFU/mL.log¹⁰ in placebo. From the above, it was observed that chewable tablets containing *Punica granatum* Linné 6.25% were able to reduce the load of *S. mutans* and gram-negative salivary microorganisms. The chewable tablet demonstrated safety in that no participant experienced adverse effects. This pilot clinical trial showed promising results; however, new studies must be carried out with a longer follow-up period and a larger population.

Keywords: Dental cavity; Chewable tablet; Pomegranate; Oral microorganisms.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Quadro 1 –	Evolução temporal do índice CPO-d no Brasil e suas Regiões em escolares.....	17
Figura 1 –	Evolução temporal do índice CPO-d no Brasil e suas Regiões em escolares.....	19
Figura 2 –	Fruto e flor de <i>Punica granatum</i> Linné (romã).....	24
Figura 3 –	Principais compostos fenólicos presentes na <i>Punica granatum</i> Linné.....	25
Figura 4 –	Principais alcaloides e flavonoides presentes na <i>Punica granatum</i> Linné.....	26
Gráfico 1 –	Variação das concentrações de microrganismos salivares antes e após o uso de pastilha mastigável contendo <i>Punica granatum</i> Linné 6,25%.....	33
Gráfico 2 –	Variação das concentrações de microrganismos salivares antes e após o uso de pastilha mastigável contendo placebo.....	34

LISTA DE TABELAS

- Tabela 1 –** Concentrações de em \log_{10} de UFC/ml de bactérias gram-negativas antes e após o uso da pastilha mastigável a base de *Punica granatum* Linné 6,25% e placebo..... 32
- Tabela 2 –** Concentrações de em \log_{10} de UFC/ml de *Streptococcus mutans* antes e após o uso da pastilha mastigável a base *Punica granatum* Linné 6,25% e placebo..... 32

LISTA DE ABREVIATURA E SIGLAS

Ágar MAS	Mitis Salivarius Agar
D7	Dia 7 do tratamento
D14	Dia 14 do tratamento
D16	Dia 16 do tratamento
D21	Dia 21 do tratamento
D31	Dia 31 do tratamento
Índice CPO-d	Número médio de dentes permanentes cariados, perdidos e obturados (restaurados)
MOGN	Microrganismos gram-negativos
SPSS	<i>Statistical Package for the Social Sciences</i>
UFC	Unidades Formadoras de Colônias
UFC/ml	Unidades Formadoras de Colônia por mililitro

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	13
2 REVISÃO DE LITERATURA	16
2.1 Cárie dentária	16
2.2 “Streptococcus mutans”	19
2.3 Doença periodontal e microbioma.....	21
2.4 “Punica granatum” Linné	24
2.4.1 Definição e composição química.....	24
2.4.2 Ação terapêutica e aplicação na saúde oral.....	26
3 OBJETIVOS.....	28
3.1 Geral	28
3.2 Específicos	28
4 METODOLOGIA	29
4.1 População, produção e administração das pastilhas	29
4.2 Análise de reações adversas	30
4.3 Coleta da saliva	30
4.4 Análise microbiológica	30
4.5 Metodologia para análise de dados	31
4.6 Interpretação dos resultados	31
5 RESULTADOS.....	32
5.2 Análises microbiológicas	32
6 DISCUSSÃO	35
7 CONCLUSÃO	39
8 PERSPECTIVAS.....	40
REFERÊNCIAS.....	41
APÊNDICE A – TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO	45
APÊNDICE B – FICHA DE ANAMNESE DADOS PESSOAIS E EXAME DENTÁRIO	
FICHA ANAMNESE.....	47
APÊNDICE C – ALGORITMO DE NARANJO.....	49
ANEXO A – PARECER DO CEP.....	50

1 INTRODUÇÃO

Estima-se que a cárie dentária acometa a população mundial quase em sua totalidade, podendo ser considerada a condição patológica mais prevalente na humanidade. Durante muitos anos, o papel do *Streptococcus mutans* foi explorado, sendo caracterizado como o principal agente causador da doença cárie; entretanto, com advento da biologia molecular foi possível verificar que outros microrganismos estão envolvidos no processo, entre eles as bactérias gram-negativas, sendo participes também do processo de cariogênese bem como da periodontite (Siqueira *et al.*, 2021; Simón-Soro; Mira, 2015; valadas *et al.*, 2019).

A cárie dentária é uma condição patológica crônica açúcar-dependente modulada por múltiplos fatores e associada à disbiose da cavidade oral. Ela se caracteriza por uma desregulação no processo des/remineralização da matriz dentária, podendo ocorrer em esmalte e/ou dentina, por meio da produção de ácidos pelos microrganismos presentes no biofilme dentário (Fraga *et al.*, 2020; Rodrigues Neto *et al.*, 2021).

Uma complexa comunidade de microrganismo está presente no biofilme dentário em situação de equilíbrio; entretanto, após a ingestão de alimentos ricos em carboidratos fermentáveis, esses microrganismos acidogênicos irão utilizar esse substrato, produzindo ácido e liberando para o meio. Nesse momento, os microrganismos ácido-resistentes prevalecem frente aos microrganismos ácido-sensíveis presentes no biofilme, favorecendo o processo de disbiose e tornando o biofilme cada vez mais acidogênico, favorecendo o processo de desmineralização da matriz dentária (Furtado Júnior *et al.*, 2020; Rodrigues Neto *et al.*, 2021).

Fatores sociais e econômicos estão relacionados a uma maior incidência de cárie dentária como: grau de instrução, dieta rica em carboidratos fermentáveis, acesso a serviços de saúde e produtos de higiene oral, assim como água de abastecimento fluoretada. Fatores relacionados ao indivíduo como idade, imunidade, níveis hormonais e salivação também serão relevantes para o desenvolvimento da doença cárie (Fraga *et al.*, 2023; Girão Júnior *et al.*, 2022; Silva *et al.*, 2019).

Dentre os fatores retentivos de placa dentária cita-se o uso de aparelhos e contenções ortodônticas, pois favorecem um maior acúmulo de biofilme, dificultando sua limpeza e desestabilização o que irá gerar um desequilíbrio do microbioma com crescimento de espécies como *S. mutans*, *Lactobacillus* spp. e bactérias gram-

negativas facilitando o processo de produção de ácidos e desmineralização da matriz dentária e concomitantemente a gengivite e doença periodontal (Furtado Júnior *et al.*, 2020; Lotif *et al.*, 2022; Siqueira *et al.*, 2021).

Os *S. mutans* são classificados como cocos gram-positivos do grupo “A” de Lancefield, sendo acidúricos e acidogênicos, que utilizam a sacarose e outros carboidratos fermentáveis para produção de polissacarídeos extracelulares para favorecer a adesão do biofilme à matriz dentária. Dessa forma, apesar de não ser o único microrganismo envolvido na cariogênese irá participar ativamente desse processo (Fraga *et al.*, 2023; Valadas *et al.*, 2021a).

Cocos gram-negativos também são encontrados na cavidade oral, os do gênero *Moraxella*, cujo principal representante é a *M. catarrhalis*, habitam principalmente a língua e a mucosa oral, sendo microrganismos potencialmente patogênicos para esses tecidos, quando em situação de desequilíbrio (Walsh; Oliveira-Neto; Moore, 2017).

Outros microrganismos gram-negativos como *Porphyromonas gingivalis*, *Tannerella forsythensis*, *Treponema denticola*, *Prevotella intermedia*, *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* estão intimamente ligados com o processo de gengivite e doença periodontal, sendo encontrados no biofilme presente nas bolsas periodontais. Entretanto, três espécies, *P. gingivalis*, *T. forsythensis* e *T. denticola*, formam o chamado complexo vermelho e são potencialmente mais patogênicas, favorecendo o processo de reabsorção óssea por conta da inflamação sustentada (Usui *et al.*, 2021).

As lesões cáries cavitadas, geralmente, são manejadas por meio de tratamento restaurador se utilizando recursos como restauração com amálgama de prata, ionômero de vidro e resinas compostas. Entretanto, novas tecnologias como aplicação de laser ou permeação de fármacos em nanopartículas são estratégias terapêuticas que buscam restaurar o tecido lesado (Cagetti *et al.*, 2015).

O uso de produtos naturais acompanha a humanidade desde os primórdios e foi protagonista no desenvolvimento da indústria farmacêutica. Existem diversas evidências da efetividade de produtos naturais na prevenção e tratamento de condições que acometem a cavidade oral como a cárie dentária, gengivite e doença periodontal. Os produtos naturais muitas vezes favorecem o acesso ampliado e a melhor aceitação pela população contribuindo para uma boa adesão ao tratamento (Furtado Júnior *et al.*, 2020; Siqueira *et al.*, 2021; Valadas *et al.*, 2021b).

Pastilhas mastigáveis são formas farmacêuticas que apresentam boa aceitação por parte dos pacientes, permitindo a autoadministração pela simplicidade de uso e que auxiliam no processo de adesão ao tratamento farmacológico. Além disso, podem carrear princípios ativos que serão liberados e irão agir na cavidade oral ou absorvidos sistemicamente, tendo a facilidade de poderem ser administradas sem a necessidade de água e já estando com uso amplamente difundido na população, disponíveis no mercado farmacêutico como produtos para tratamento de afecções da orofaringe e halitoses (Fraga *et al.*, 2023; Siqueira *et al.*, 2021).

Nesse contexto a *P. granatum* Linné (romã) se apresenta como uma alternativa natural para auxiliar no controle de microrganismo orais envolvidos nos processos de cariogênese, pulpíte, necrose pulpar, gengivite e doença periodontal. Em sua composição fitoquímica apresenta constituintes ativos importante: flavonoides, taninos como a punicalagina e outros compostos fenólicos, responsáveis por suas ações terapêuticas. Estudos anteriores já avaliaram a ação de produtos farmacêuticos veiculando extrato de *P. granatum* Linné em próteses dentárias, canais radiculares e na forma de colutórios (Carvalho Neto *et al.*, 2021; Esawy *et al.*, 2019; Mallya *et al.*, 2019).

Este estudo objetivou avaliar a atividade antimicrobiana de uma pastilha mastigável contendo extrato de *P. granatum* Linné em concentrações salivares de microrganismos orais gram-negativos e *S. mutans*.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Cárie dentária

A cárie dentária é uma condição patológica crônica açúcar-dependente causada por uma disbiose na cavidade oral e modulada por múltiplos fatores, que em desequilíbrio irá favorecer a desmineralização da matriz dentária em esmalte ou dentina num processo induzido pela produção de ácidos pela microbiota cariogênica no biofilme dentário (Fraga *et al.*, 2020; Rodrigues Neto *et al.*, 2021).

Tendo em vista a sua epidemiologia, a cárie dentária é um processo patológico que pode acometer de 80-90% da população mundial e, quando não tratada de forma adequada, será a principal causa de ausências de elementos dentários (Simón-Soro; Mira, 2015; Wang *et al.*, 2021).

No Reino Unido verificou-se que 34% das crianças de 12 anos e 46% das crianças de 15 anos apresentaram experiência de “cárie óbvia” (lesão não cavitada na dentina), mas que 57% e 63% delas, respectivamente, apresentaram lesões precoces de cárie no esmalte não cavitada (Wang *et al.*, 2021).

Países como Brasil, México e Colômbia apresentaram, nos últimos anos, redução na taxa de cáries em dentes prementes. Entretanto, na América Latina, no geral, ainda se apresenta uma situação alarmante, na qual estima-se que mais de 50% das crianças e mais de 85% dos adultos tenham sofrido experiência de cárie em dentição decídua (Sampaio *et al.*, 2021).

No Brasil, o Ministério da Saúde realizou levantamentos epidemiológicos nacionais em saúde bucal em 1986, 1996, 2003 e 2010. O público analisado foram crianças com idade de 12 anos. Em 2003, 69% da população estudada apresentava cárie dentária. Entretanto, no ano de 2010, houve diminuição para 56%. Pode-se inferir que houve investimentos governamentais que favoreceram uma melhora nas condições bucais dos adolescentes desta faixa etária, por meio de políticas públicas, que minimizaram as dificuldades de acesso ao serviço de saúde bucal e tratamento odontológico (Brasil, 2012).

Os inquéritos de saúde bucal internacionais adotam a idade de 12 anos como parâmetro básico para uso do índice CPO-d [que significa o número médio de dentes permanentes cariados, perdidos e obturados (restaurados)]. Os valores do índice correspondem aos graus de severidade: muito baixo (0,0 a 1,1); baixo (1,2 a

2,6); moderado (2,7 a 4,4); alto (4,5 a 6,5); e muito alto (6,6 e mais). Condições socioeconômicas desfavoráveis, baixo nível de instrução dos cuidadores, dificuldade de acesso aos serviços de saúde, hábitos de higiene deficitários e dieta cariogênica levam a valores elevados desse índice, que indica más condições de saúde bucal da população, assim como também pode indicar limitado acesso ao flúor (Brasil, 2012).

No Brasil, em 2010, obteve-se um índice CPO-d de 2,1, correspondendo a um grau de severidade baixo. Assim, foi verificada redução evolutiva nesse índice desde o primeiro inquérito de saúde bucal em 1986 (Quadro 1; Brasil, 2011).

Quadro 1 – Evolução temporal do índice CPO-d no Brasil e suas Regiões em escolares

Região	1986	1996	2003	2010
Brasil	6,7	3,1	2,8	2,1
Norte	7,5	4,3	3,1	3,2
Nordeste	6,9	2,9	3,2	2,7
Sudeste	6,0	2,1	2,3	1,7
Sul	6,3	2,4	2,3	2,0
Centro-Oeste	8,5	2,9	3,2	2,6

Fonte: Brasil (2011).

Nos últimos anos, a doença cárie teve sua prevalência diminuída, assim como os graus de severidade das lesões em países desenvolvidos. Entretanto, percebe-se que ela ainda é um desafio para os programas de saúde pública de países em desenvolvimento, tendo em vista alguns determinantes como: alto consumo de calorias vazias por meio carboidratos fermentáveis, baixa exposição ao fluoreto em produtos de higiene, e dificuldade no acesso a serviços de saúde bucal (Fraga *et al.*, 2020; Hancock; Zinn; Schofield, 2020).

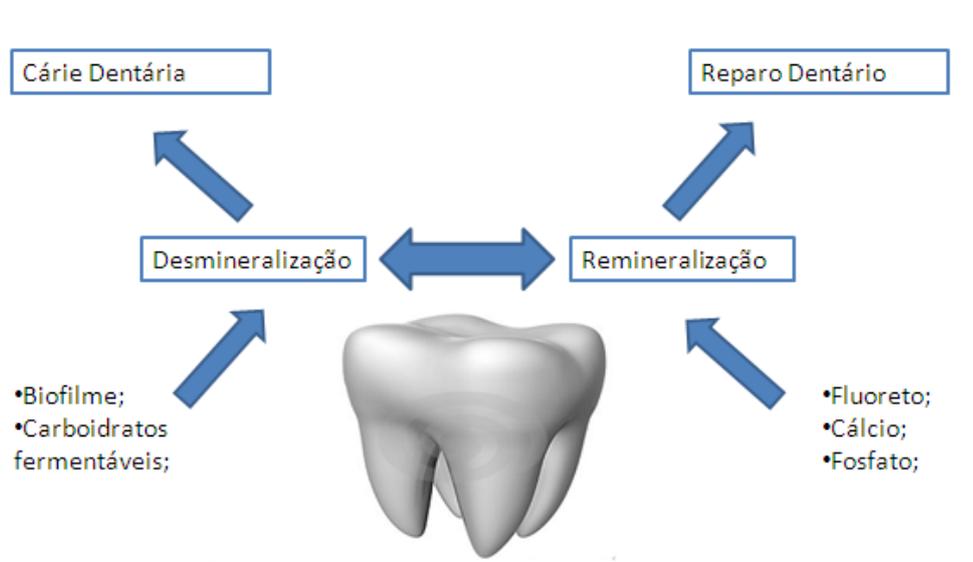
Já está bem estabelecida a relação entre a alta ingestão alimentar de açúcares e a cárie dentária, tendo em vista que sua patogênese é um mecanismo dependente do carboidrato fermentável proveniente da dieta. Foi verificado, também, que a experiência de cárie é menor em adultos e crianças que apresentam um perfil de consumo inferior a 10% de açúcares livres na sua ingestão energética total (Hancock; Zinn; Schofield, 2020).

Além da quantidade de carboidratos da dieta, o tipo de açúcar ingerido também é relevante para a cariogenicidade do alimento. Alimentos ricos em amidos e farináceos refinados tendem a ser mais retentivos, o que favorece sua adesão na

parede dentária e maior interação com o biofilme que irá utilizá-lo como substrato para a produção de ácido e glucano. Outra questão importante é que farináceos e amido que foram cozidos e processados, além de bebidas adoçadas como refrigerantes, apresentam uma maior acidez em meio bucal, favorecendo ainda mais o processo de desmineralização por uma via direta (Hancock; Zinn; Schofield, 2020).

A estrutura mineral dentária é formada majoritariamente por hidroxiapatita; sua perda faz parte do processo patológico da doença cárie. Naturalmente, ocorrem fases, na superfície dentária, de ganho mineral (remineralização) e perda mineral (desmineralização) em superfícies cobertas por biofilmes íntegros. Quando a desmineralização atinge um nível maior que a mineralização, tem-se instalada a cariogênese (fig. 1; Fraga *et al.*, 2020).

Figura 1 – Processo simplificado des / remineralização



Fonte: Rodrigues Neto (2017).

A saliva é a primeira barreira biológica no processo defensivo contra a erosão dentária, ela forma uma película na superfície dentária, que apresenta efeito tamponante, capacidade de diluir e neutralizar ácidos, além de fornecer íons cálcio e fosfato, diminuindo a taxa de desmineralização e aumentando a taxa de mineralização da matriz dentária, dessa forma o estímulo da salivagem é uma estratégia protetora frente a cárie, que pode ser conseguido pela mastigação (Lopes *et al.*, 2020).

2.2 “*Streptococcus mutans*”

Uma das pedras fundamentais da microbiologia clínica, o postulado clássico de *Koch*, descreve que uma doença infecciosa sempre será causada por um microrganismo patogênico, sendo esse um norteador para prática clínica. Em meados da década de 1920, houve o isolamento de *S. mutans* em lesões cariosas cavitadas; dessa forma, tendo mente o famoso postulado de *Koch*, o microrganismo em questão foi caracterizado como o agente etiológico da doença cárie. Sua importância clínica perdurou durante décadas como o principal patógeno envolvido nesse processo. Dessa forma, essas bactérias nortearam, por muitos anos, as condutas de prevenção, diagnóstico e tratamento dessa condição clínica (Fraga *et al.*, 2023; Rodrigues Neto *et al.*, 2021; Siqueira *et al.*, 2021; Simón-Soro; Mira, 2015).

No entanto, com o passar dos anos e avanços de novas pesquisas no campo da cariologia, o protagonismo do *S. mutans* começou a ser dividido com novos atores, microrganismos que também foram isolados em lesões cariosas cavitadas: *Lactobacillus* spp. e *Bifidobacterium* spp. Dessa forma, foi verificado que não existia apenas um agente cariogênico, mas que a gênese das lesões cariosas era favorecida por uma complexa associação de microrganismo acidúricos e acidogênicos presentes no biofilme bacteriano aderido à superfície dentária (Siqueira *et al.*, 2021; Simón-Soro; Mira, 2015).

Os *S. mutans* são cocos gram-positivos, α -hemolíticos, catalase negativos, anaeróbios facultativos, acidogênicos e acidúricos; eles apresentam a capacidade de formar polissacarídeos extracelulares, por meio do aproveitamento energético da hidrólise, predominantemente da sacarose em dietas altamente cariogênicas, favorecendo a adesão bacteriana a superfície dentária, assim como, outros microrganismos num complexo biofilme organizado (Fraga *et al.*, 2020; Fraga *et al.*, 2023).

Apesar do *S. mutans* não ser o principal microrganismo envolvido no processo da cariogênese, por conta do tempo de pesquisa e conhecimento de suas estruturas e metabolismo, bem como sua forte presença no biofilme dentário maduro e estável, continuam sendo o principal microrganismo pesquisado, com marcadores indiretos de corrupção do biofilme. O aumento de concentração de *S. mutans* no biofilme bacteriano está relacionado a uma maior disbiose da comunidade microbiana

e um risco aumentado do surgimento e progressão de lesões cáries frente a uma dieta cariogênica (Fraga *et al.*, 2020; Rodrigues Neto *et al.*, 2019).

Num cenário de equilíbrio do microbioma oral, microrganismo acidogênicos utilizam os carboidratos fermentáveis provenientes da dieta em seu metabolismo, que favorece o processo de desmineralização da matriz dentária mediado por ácido, dessa forma quanto mais aderido à superfície dentária e quanto mais ácido for produzido maior a probabilidade de uma desmineralização mais efetiva culminando em uma cavitação cáries (Fraga *et al.*, 2020; Silva *et al.*, 2019; Simón-Soro; Mira, 2015).

Uma comunidade microbiológica organizada em uma matriz extracelular adesiva que fica aderida as superfícies dentárias constitui o biofilme, que em condições propícias como uma grande ingestão de carboidratos fermentáveis, poderá haver corrupção desse microssistema culminando em alterações bioquímicas e microbiológicas que irão favorecer o processo de desmineralização (Simón-Soro; Mira, 2015).

Quando esse biofilme maduro se mantém acumulado sobre as superfícies dentárias, se tem um fator crítico para desenvolvimento da lesão cáries. Se o controle mecânico não ocorre e não há a desestabilização do biofilme amadurecido, assim ocorrerá uma pressão natural com seleção de microrganismo acidúricos e acidogênicos como os dos gêneros *Streptococcus* spp. e *Lactobacilos* spp. que serão agora dominantes favorecendo um menor pH do meio e, conseqüentemente, o processo de desmineralização dentária (Fraga *et al.*, 2020; Simón-Soro; Mira, 2015).

O processo de pressão seletiva dos microrganismos no biofilme pode ser elucidado da seguinte maneira: de modo inicial existe uma alta oferta de carboidratos fermentáveis oriundos da dieta na cavidade oral. Dessa forma, os microrganismos os utilizam em processos fermentativos, que servindo ao seu metabolismo energético, gerando ácido como produto das reações bioquímicas. Além disso, também ocorre a síntese de polissacarídeos extracelulares para adesão do biofilme. Num segundo momento, ocorre um período de “fome de açúcar”, causando a seleção dos microrganismos mais adaptados às condições do meio (Fraga *et al.*, 2020; Rodrigues Neto *et al.*, 2021; Simón-Soro; Mira, 2015).

Em recente estudo foi verificado que o consumo de alimentos e suplementos ricos em nitratos geram uma resiliência no biofilme, diminuindo a produção de ácidos e, conseqüentemente, a diminuição do pH no meio. Sendo verificado também aumento do consumo de lactato pelas bactérias, assim como o

crescimento de indivíduos do gênero *Rothia* e *Neisseria* no biofilme (ROSIER *et al.*, 2021).

Esses microrganismos foram estudados intensamente nas últimas décadas, tendo sido isolados constantemente na cavidade oral. Oito sorotipos correspondentes ao grupo *mutans* são reconhecidos atualmente e já é estabelecido que indivíduos que apresentam um desequilíbrio do microbioma na superfície dentária possuem também uma maior carga microbiana de *S. mutans* e *S. sobrinus* na cavidade oral (Maki *et al.*, 2014).

2.3 Doença periodontal e microbioma

A periodontite pode ser classificada como uma doença crônica inflamatória, multifatorial e, quando não abordada adequadamente, pode levar a danos irreversíveis aos tecidos de sustentação dentário (ligamento periodontal, cemento e osso alveolar) e, conseqüentemente, a perdas dentárias. Dentre os determinantes de gênese e progressão da doença periodontal verifica-se uma intensa carga microbiana na placa dentária que leva ao organismo a um revide com uma resposta exacerbada imune-inflamatória (Liccardo *et al.*, 2019).

Ressalta-se que, além da importância evidente para saúde oral do paciente, a doença periodontal apresenta repercussões patológicas sistêmicas, haja vista a relação já bem documentada entre a doença periodontal e a dificuldade do controle glicêmico do paciente diabético, assim como a maior taxa de progressão da doença periodontal no paciente diabético não controlado. Além disso, já é verificado que a doença periodontal será um agravante no escore do fator de risco cardiovascular (Graves; Ding; Yang, 2020; Liccardo *et al.*, 2019).

Condições inflamatórias crônicas, como no quadro de obesidade, tendem a levar os indivíduos a agravar a progressão da doença periodontal, modulando a sua gravidade. Assim, foi estabelecida uma relação entre a adiposidade abdominal e o agravamento da doença periodontal. Além da inflamação, a microbiota da cavidade oral tende a ser modificada, principalmente no que diz respeito aos membros do complexo vermelho (*Porphyromonas gingivalis*, *Tannerella forsythia* e *Treponema denticola*). Fatores como índice de massa corporal e circunferência da cintura afetam negativamente essa relação. Outra questão relevante é que a adiposidade abdominal aumentada favorece a resistência à insulina, fazendo com que se tenha níveis de

glicose mais elevados. Assim, a situação de hiperglicemia sustentada também resultada num pior prognóstico da evolução doença periodontal (Andrade *et al.*, 2021; Graves; Ding; Yang, 2020; Liccardo *et al.*, 2019).

Na cavidade oral, uma diversidade de comunidades microbianas se desenvolve aderidas às superfícies radiculares. Nesse ambiente, se tornam protegidas da ação do oxigênio e das forças de cisalhamento que ocorrem durante a mastigação. Essas comunidades que residem no meio subgengival utilizam o fluido crevicular gengival como fonte nutricional. Esses complexos grupos são compostos por vários microrganismos (bactérias, archaea, fungos e vírus). Deste, as bactérias são os indivíduos mais abundantes, sendo representados por aproximadamente 500 espécies na placa subgengival. Bactérias do gênero *Actinomyces* spp., cocos gram-positivos, são as mais abundantes em situação saúde periodontal, sendo os primeiros microrganismos a colonizar as superfícies dentárias híidas. Em conjunto com os *Streptococcus* spp., os *Actinomyces* spp. formam as bases da placa dentária. Em suma, em um cenário de saúde periodontal e gengival, o biofilme será composto por bactérias gram-positivas e algumas poucas espécies gram-negativas, mas que são abundantes em número de indivíduos (Curtis; Diaz; Van Dyke, 2020).

Evidências demonstram que numa higiene oral deficitária ocorre alteração nas espécies dominantes presente na comunidade microbiológica subgengival. Após duas a três semanas, com acúmulo de placa dentária estabilizada, ocorrerá uma corrupção do biofilme com colonização intensa de morfotipos gram-negativos (bastonetes, filamentosos e espiroquetas) culminando na inflamação clínica do tecido gengival. Dessa forma, o processo de gengivite ocorre com a depleção de espécies gram-positivas no meio e o exponencial crescimento de gram-negativas como *Prevotella* spp., *Selenomonas* spp., e *F. nucleatum* ss. *polymorphum* (Curtis; Diaz; Van Dyke, 2020; Mira; Simon-Soro; Curtis, 2017).

Assim como na gênese da gengivite, o desenvolvimento da periodontite está intimamente ligado a uma disbiose nas comunidades subgengivais. Novamente se tem um enriquecimento do biofilme com microrganismos gram-negativos, porém diferentes daqueles encontrados na situação de gengivite. Entre as espécies prosperas nesse processo cita-se a tríade do complexo vermelho: *T. denticola*, *P. gingivalis* e *Tannerella forsythia*; entretanto, vários outros gêneros de *Treponema* spp. são abundantes nesse meio. Diferentemente de outras condições clínicas nas quais se tem uma diminuição da diversidade da microbiota (cárie dentária e doença

inflamatória intestinal), na doença periodontal ocorre o contrário, com aumento de espécies presentes no biofilme, o que denota uma cooperação para utilização dos nutrientes entre os diversos nichos provenientes do fluido crevicular. Além disso, alguns microrganismos residentes como a *P. gingivalis* apresentam a capacidade de modular negativamente a imunidade por inibição da atividade da interleucina-8, favorecendo o crescimento microbiano; situação semelhante que se encontra em lesões de câncer colorretal e pólipos (Curtis; Diaz; Van Dyke, 2020; Mira; Simon-Soro; Curtis, 2017).

Na cavidade oral há uma complexa comunidade de microrganismo que, em disbiose, pode culminar em doenças. Além das bactérias do gênero *Streptococcus* spp. e *Lactobacilos* spp. outros microrganismos podem participar do processo cariogênico como os gram-negativos que também podem participar de gênese da doença periodontal (Curtis, 2017; Lotif *et al.*, 2022; Mira; Simon-Soro; Furtado Junior *et al.*, 2018; Nyvad; Takahashi, 2020).

O pH do biofilme, geralmente, varia de 5.5 a 7.0; entretanto, em situações de desequilíbrio alimentar, salivar ou inflamatório podem causar variações no pH, favorecendo processos como a cariogênese ou gengivite, a depender do desvio de pH ocasionado (Mira; Simon-Soro; Curtis, 2017; Nyvad; Takahashi, 2020).

O equilíbrio do pH também pode ser modificado para valores mais altos, situação que ocorre em resposta à gengivite, numa reação inflamatória ao desafio microbiano, levando a quebra da homeostase e a degradação do periodonto. Na gengivite se aumenta a produção de fluido crevicular no sulco gengival, assim são liberados produtos alcalinos citotóxicos que levam o pH próximo a um ambiente de neutralidade. Como resposta, a comunidade microbiana entra num estágio de degradação de proteínas e aminoácidos, essa proteólise contínua, juntamente com a ação de bactérias que neutralizam ácido (*Fusobacterium* spp. e *Prevotella* spp.) auxiliam na formação de um ambiente alcalino e favorecem a sucessão e colonização do meio por bactérias que apresentam tropismo por tecidos inflamados (“inflamofílicas”) e que são sensíveis ao meio ácido como *Porphyromonas gingivalis* (Mira; Simon-Soro; Curtis, 2017; Nyvad; Takahashi, 2020).

2.4 “*Punica granatum*” Linné

2.4.1 Definição e composição química

A *Punica granatum* Linné é um vegetal de vida longa podendo alcançar até 200 anos de longevidade. Em média, alcança de 12 a 16 pés de altura, apresenta folhas brilhantes e flores vermelhas, brancas, geralmente grandes, tem cálice tubular e apresentam um fruto vermelho escuro (fig. 2), a romã, em forma de granada, tendo as sementes envolvidas numa membrana embebidas por um sumo vermelho e azedo, sendo separadas por um pericarpo membranoso e branco. A romã é o membro mais conhecido da família Punicaceae, acredita-se que sua origem seja no Afeganistão e Irã, sendo uma planta vastamente cultivada em toda a Ásia Central, Himalaia, Leste, sudoeste americano (inclusive no Brasil) e área mediterrânea (Eghbali *et al.*, 2021).

Figura 2 – Fruto e flor de *Punica granatum* Linné (romã)



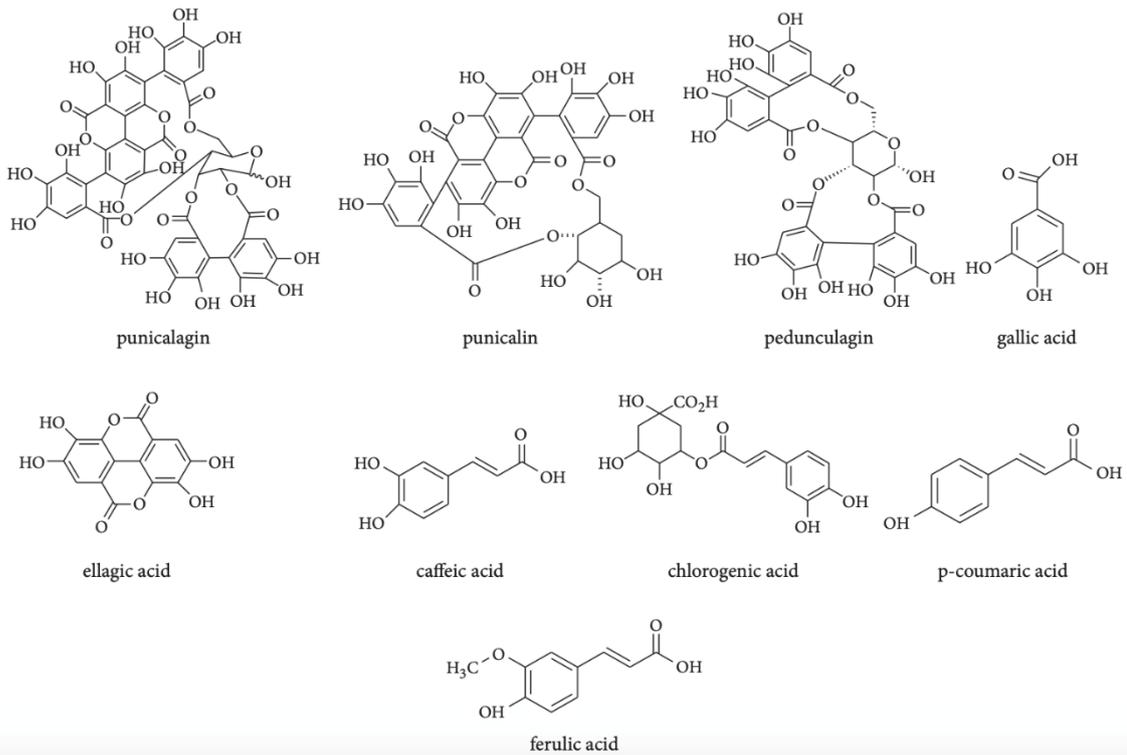
Fonte: Mundo Educação (2023).

Os polifenóis são a principal classe de compostos químicos encontrados nos produtos de extração da *P. granatum* Linné. Dentre eles os mais abundantes são os taninos hidrolisáveis (galotaninos, elagitaninos, ésteres galagílicos, hidroxicinâmicos ácidos e ácidos hidroxibenzóicos.), responsáveis pela ação adstringente que “trava a boca”. A punicalagina é o principal representante dos elagitaninos, sendo encontrada no pericarpo, casca, flores e sementes, podendo ser isolada cromatograficamente. Ácido gálico, ácido elágico, ácido cafeico, ácido clorogênico, ácido p-cumárico, aglicona, e o ácido ferúlico também foram isolados da

romã. A estrutura desses compostos pode ser verificada na figura 3 (Carvalho Neto *et al.*, 2021; Esawy *et al.*, 2019; Eghbali *et al.*, 2021; Mallya *et al.*, 2019).

Figura 3 – Principais compostos fenólicos presentes na *Punica granatum*

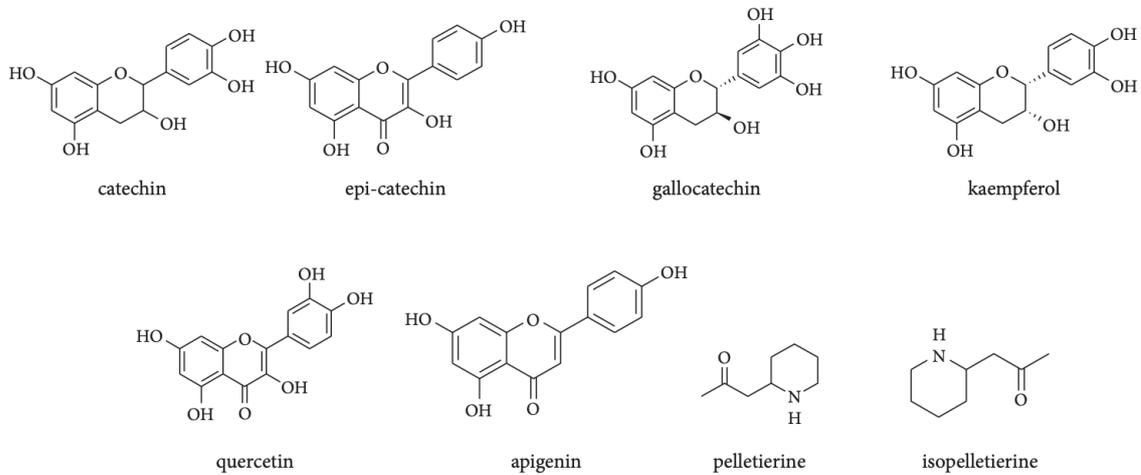
Linné



Fonte: Adaptado de Eghbali *et al.* (2021)

Na romã também são encontrados flavonóis e flavonas como: catequina, epicatequina, galocatequina, kaempferol, quercetina e apigenina (fig. 4). Esses podem ser identificados cromatograficamente. Além destes, é verificado a presença de alcaloides, ácidos orgânicos, lignanas, minerais e esteroides (Eghbali *et al.*, 2021; Esawy *et al.*, 2019; Mallya *et al.*, 2019).

Figura 4 – Principais alcaloides e flavonoides presentes na *Punica granatum* Linné



Fonte: Adaptado de Eghbali *et al.* (2021).

2.4.2 Ação terapêutica e aplicação na saúde oral

Além das propriedades nutricionais da *P. granatum* Linné que estão bem documentadas na literatura, podendo inclusive ser candidata a aditivo alimentar natural por suas propriedades antimicrobianas e antioxidantes, apresenta ainda diversas atividades terapêuticas como ações antibacteriana, antifúngica, antiviral e anti-inflamatória. Dessa forma, podendo ter diversas aplicações clínicas seja por uso popular ou clínico validado. Seu uso já foi verificado em situações como diarreia, disenteria, hemorroidas, parasitas intestinais, dor de garganta, diabetes, epistaxe e coceira vaginal, existindo ainda a possibilidade ação cardiotônica (Eghbali *et al.*, 2021; Mohammad *et al.*, 2012).

Estudos já demonstram efeito da *P. granatum* Linné no tratamento adjuvante da diabetes, onde foi verificado a redução da glicemia em jejum. Esse efeito provavelmente se deve ao alto teor de constituintes químico antioxidantes por favorecer a secreção de insulina pelas células beta pancreáticas, melhorar a sensibilidade dos tecidos ao hormônio e diminuir o estresse oxidativo e peroxidação lipídica (Parsaeyan *et al.*, 2012). Outra questão importante é que a melhora no controle dos níveis glicêmicos leva a uma melhora na condição da saúde oral, principalmente quando se trata de saúde periodontal (Graves; Ding; Yang, 2020; Liccardo *et al.*, 2019). A ação da *P. granatum* Linné sobre o perfil lipídico também foi verificada, se

demonstrou que sua utilização em pacientes diabéticos e com dislipidemias foi capaz de reduzir o colesterol total, fração LDL (Parsaeyan *et al.*, 2012).

O efeito antioxidante da *P. granatum* Linné foi correlacionado com a diminuição de níveis pressóricos em pacientes hipertensos tratados com seu extrato com redução das concentrações de enzima conversora de angiotensina, gerando dessa forma um efeito cardioprotetor, podendo até apresentar ação protetora na remodelação cardíaca pós infarto (Eghbali *et al.*, 2021).

Diversos estudos demonstraram que o extrato de *P. granatum* Linné foi capaz de inibir a proliferação de células tumorais e induzir a sua apoptose. A literatura relata sua ação em câncer colorretal, cabeça e pescoço e próstata, assim como a proteção de mucosite oral e dermatites induzidas por irradiação por radioterapia em câncer de cabeça e pescoço. Dessa forma, a suplementação em pacientes oncológicos pode ser benéfica por conta principalmente da ação do ácido elágico (Thotambailu; Bhandary; Sharmila, 2019).

Na placa dentária e na gengivite a *P. granatum* Linné apresenta ação terapêutica por meio dos seus compostos, principalmente flavonoides, anti-inflamatórios e sequestradores de radicais livres que são capazes de reduzir o estresse oxidativo mediado por macrófagos e a peroxidação lipídica. Além disso, já está documentado também sua ação na redução das concentrações de *S. mutans* da cavidade oral de modo semelhante a clorexidina, assim como sua atividade no controle da placa dentária (Mishra *et al.*, 2019; Prasad; Kunnaiah, 2014). Outros estudos demonstraram que o uso da *P. granatum* Linné foi capaz de reduzir os sinais clínicos da periodontite, sua progressão e os níveis de interleucinas inflamatórias teciduais (Sastravaha *et al.*, 2003; Sastravaha *et al.*, 2005).

Dados de um ensaio clínico publicado demonstraram que a *P. granatum* Linné se apresenta útil no tratamento da estomatite, podendo ser utilizada veiculada na forma de géis orais e colutórios apresentando efeito na redução da dor nas lesões e redução no tempo para a cura total (Ghalayani *et al.*, 2013). Além disso, outro estudo demonstrou a sua ação na forma de gel na estomatite protética de modo semelhante ao Miconazol gel no combate a biofilme formado por *Candida* spp. (Vasconcelos, 2003).

3 OBJETIVOS

3.1 Geral

Avaliar uma pastilha mastigável à base *Punica granatum* Linné na redução da contagem de microrganismos orais em amostras de saliva estimulada de voluntários adultos que fazem uso de aparelho ortodôntico.

3.2 Específicos

- a) Determinar as variações na quantidade de *S. mutans* através da quantificação das Unidades Formadoras de Colônias por mililitro (UFC/ml) após o uso da pastilha;
- b) Avaliar as variações na quantidade de microrganismos gram-negativos através da quantificação das Unidades Formadoras de Colônias por mililitro (UFC/ml) após o uso da pastilha;
- c) Avaliar a segurança da pastilha mastigável contendo *P. granatum* Linné por meio de avaliação de relato de reação adversa com aplicação do algoritmo de Naranjo.

4 METODOLOGIA

4.1 População, produção e administração das pastilhas

Um total de 12 voluntários adultos, de ambos os sexos, livres de cáries, usuários de aparelhos ortodônticos fixos que foram acompanhados no complexo odontológico do Centro Universitário Católica de Quixadá, com índice de placa visível (o cálculo do índice é executado dividindo-se o número de superfícies contendo placa pelo número total de superfícies examinadas), foram avaliados por exame clínico. Assim, foram randomicamente distribuídos para serem administradas as pastilhas placebo e as pastilhas que continham os produtos naturais.

O processo de produção da pastilha mastigável foi realizado no laboratório da Farmácia Escola do Centro Universitário Católica de Quixadá. O princípio ativo, extrato glicólico de *P. granatum* Linné 6,25% (concentração final), foi obtido do Vale da Juruena no Estado brasileiro de Mato Grosso (Região: Centro-Oeste, Latitude: 10°19'05" S, Longitude: 58°21'32" W, Altura: 300 m). Amostras foram depositadas no herbário-voucher BI 31659 da Universidade Federal de Mato Grosso. Os constituintes químicos (punicalagina, ácido gálico, quercetina e ácido p-cumárico) foram identificados por especialistas do Departamento de Química da Universidade Federal do Ceará (GC– MS, Shimadzu, modelo QP 5050, Japão).

Este estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa do Centro Universitário Católica de Quixadá (parecer nº 3.935.708). Conforme resolução nº. 466/12 de pesquisa envolvendo seres humanos e com a declaração de Helsinque sob os princípios éticos para pesquisas médicas envolvendo seres humanos.

Então foi apresentado aos voluntários o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido, no qual foram instruídos sobre a cooperação e utilização da pastilha mastigável neste estudo. Participantes com histórico de alergias com asma, urticaria, rinite, sinusite ou lesão intraoral de tecidos moles foram excluídos do estudo. Nenhum dos participantes deveria ter se submetido a tratamento antimicrobiano até três meses antes do início do estudo, nem durante o curso deste ensaio clínico.

Cada participante mascou a pastilha mastigável uma única vez (USO ÚNICO), em um período de três a cinco minutos (deglutição). Logo após, foram coletadas as amostras, onde um grupo recebeu aleatoriamente o placebo (pastilha

mastigável sem constituintes) e a outro grupo recebeu a pastilha teste (pastilha mastigável contendo *P. granatum* Linné 6,25%).

4.2 Análise de reações adversas

Após a administração da pastilha mastigável contendo o princípio ativo *P. granatum* Linné, foi realizada uma análise das reações adversas ao uso. Para isso, os voluntários foram questionados sobre o aparecimento de sintomas tais como prurido, irritação, vermelhidão, sensação de queimação na cavidade oral, náuseas, cólicas intestinais e desconforto laríngeo. Usou-se o algoritmo de Naranjo como instrumento de avaliação.

4.3 Coleta da saliva

Duas amostras de saliva foram coletadas por etapas. Na primeira etapa, o paciente mascou um pedaço de Parafilm® (3 cm x 3 cm), para estimular a salivação e liberação das bactérias do biofilme dentário. Após o período de 60 segundos, a saliva foi coletada com auxílio de uma pipeta de *Pasteur* (3 ml) da boca do voluntário e colocada em frasco estéril (Eppendorf®) marcado por um número de identificação para posterior análise.

Já a segunda etapa da coleta foi realizada após a utilização/deglutição da pastilha mastigável, onde todos os participantes foram orientados sobre instruções de escovação, não beber, comer ou realizar métodos químicos ou mecânicos de controle do biofilme por, pelo menos, uma hora antes das coletas. Para minimizar a influência dos ritmos circadianos no fluxo salivar todas as amostras foram coletadas entre 9:00 e 11:00 horas.

4.4 Análise microbiológica

Para isolamento e contagem UFC/ml de *S. mutans* e bactérias gram-negativas foram realizadas diluições de 1:10 em solução salina 0,9% estéril, homogeneizada em agitador de tubo por 30 segundos. Um volume de 0,1 ml de cada amostra foi transferido para um tubo de ensaio estéril, contendo 0,9 ml de solução salina.

O volume correspondente a 10 µl de cada amostra de saliva (diluição) foi semeado de forma quantitativa no Ágar MAS (*Mitis Salivarius Agar*) suplementado com bacitracina (50 µg/ml) e telurito de potássio 1%. A mesma diluição das amostras foi feita para o Ágar MacConkey.

Para análise microbiológica a saliva foi transportada para o laboratório de microbiologia em frascos estéreis, contendo gelo (2-8 °C) que permite a análise em até duas horas, as placas foram incubadas a 37 °C por 48 horas (MAS), em frascos sobre condições microaerófilas, e 24 horas (Ágar MacConkey). Após incubação, foi realizada a contagem estimada das colônias de *Streptococcus* do grupo *mutans* e bactérias gram-negativas, multiplicando-se o número de colônias em uma área padronizada de 1 cm² pelo respectivo fator de diluição, sendo expresso o valor em UFC/ml de saliva.

4.5 Metodologia para análise de dados

O teste de *Mann-Whitney* (paramétrico) foi utilizado para comparar as médias das duas amostras. Também foi utilizado o teste *Wilcoxon*, uma vez que as amostras são pequenas. Em todos os testes foi adotado um nível de significância de 95%.

4.6 Interpretação dos resultados

Após a coleta de dados através dos formulários, os mesmos foram inseridos, analisados e organizados através de tabelas e gráficos, no banco de dados do Microsoft® Excel 2016 e *Statistical Package for the Social Sciences* (SPSS®) versão 24.0, para Windows.

5 RESULTADOS

5.1 Efeitos adversos

Durante e após a administração das pastilhas mastigáveis contendo *P. granatum* Linné 6,25% nenhum dos voluntários apresentou sinais ou sintomas de reações adversas, sendo classificado, assim como *score* 0 no algoritmo de Naranjo.

5.2 Análises microbiológicas

Na tabela 1 são expressas as concentrações de microrganismos gram-negativos salivares, em \log_{10} de UFC/ml, do grupo placebo e do grupo que recebeu a pastilha mastigável contendo *P. granatum* Linné 6,25%, antes e após o tratamento. Verifica-se que as reduções intra e intergrupos foram estatisticamente significantes.

Tabela 1 – Concentrações de em \log_{10} de UFC/ml de bactérias gram-negativas antes e após o uso da pastilha mastigável a base de *Punica granatum* Linné 6,25% e placebo

	Antes	Depois	p-value ¹	Varição	p-value ²
<i>P. granatum</i> Linné	1.20 (0.24)	0.00 (0)	0,034	-1.20 (0.24)	0,004408
Placebo	1.44 (0.67)	1.53 (0.24)	0,181	0.09 (0.11)	

¹ Teste de *Wilcoxon*; ² Teste de *Mann-Whitney*.

Na tabela 2 são expressas as concentrações de *S. mutans* salivares, em \log_{10} de UFC/mL, do grupo placebo e do grupo que recebeu a pastilha mastigável contendo *Punica granatum* Linné 6,25% antes e após o tratamento. Verifica-se que as reduções intra e intergrupos foram estatisticamente significantes

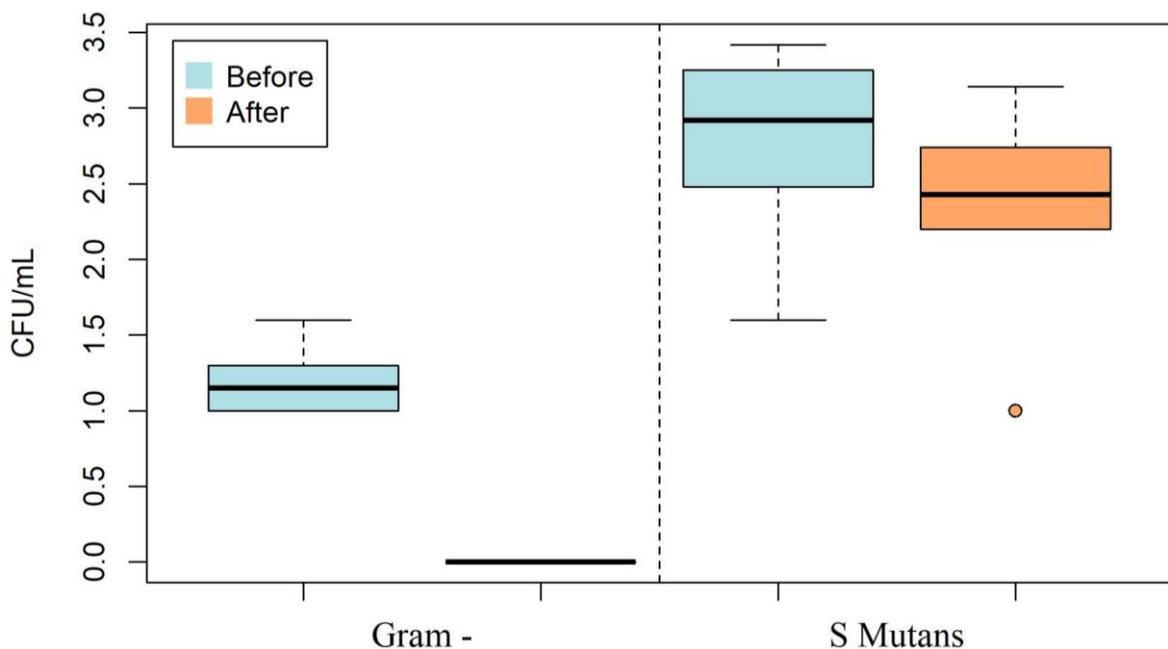
Tabela 2 – Concentrações de em \log_{10} de UFC/ml de *Streptococcus mutans* antes e após o uso da pastilha mastigável a base *Punica granatum* Linné 6,25% e placebo

	Antes	Depois	p-value ¹	Varição	p-value ²
<i>P. granatum</i> Linné	2.77 (0.66)	2.32 (0.73)	0,031	-0.44 (0.41)	0,002165
Placebo	2.20 (0.83)	2.29 (0.71)	0,419	0.08 (0.19)	

¹ Teste de *Wilcoxon*; ² Teste de *Mann-Whitney*.

No Gráfico 1 se comparam as medias de variação de concentração salivar de Unidades Formadoras de Colônias (UFC) \log_{10} de *S. mutans* e bactérias gram-negativas antes e após o uso da pastilha mastigável contendo *P. granatum* Linné 6,25%. Verifica-se que houve redução significativa das concentrações salivares dos microrganismos testados.

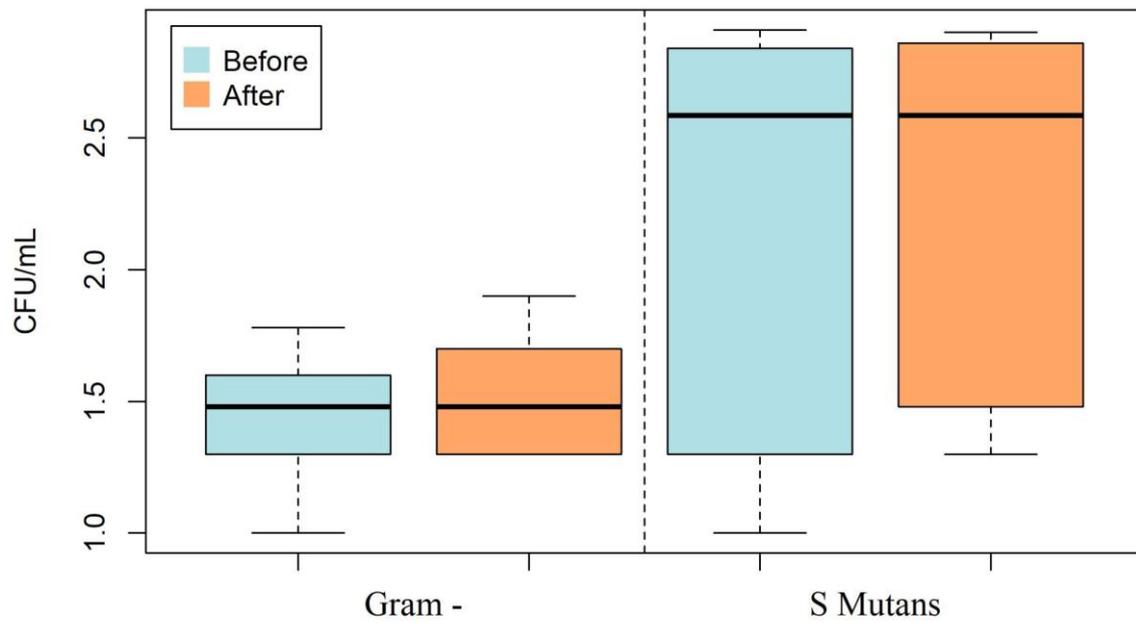
Gráfico 1 – Variação das concentrações de microrganismos salivares antes e após o uso de pastilha mastigável contendo *Punica granatum* Linné 6,25%



Fonte: elaborado pela autora.

No Gráfico 2 se comparam as medias de variação de concentração salivar de Unidades Formadoras de Colônias (UFC) \log_{10} de *S. mutans* e bactérias gram-negativas antes e após o uso da pastilha mastigável placebo. Verifica-se que houve aumento das concentrações salivares dos microrganismos testados.

Gráfico 2 – Variação das concentrações de microrganismos salivares antes e após o uso de pastilha mastigável contendo placebo



Fonte: elaborado pela autora.

6 DISCUSSÃO

Atualmente, a prospecção de recursos naturais alternativos e adjuvantes para o controle da doença cárie é uma realidade. Esses esforços tendem a unir a terapêutica clássica, já bem documentada em evidências de alto impacto, como os fluoretos, e os conhecimentos da etnobotânica com produtos naturais muitas vezes utilizados de forma ampla por população regional (Rodrigues Neto *et al.*, 2020; Rodrigues Neto *et al.*, 2021).

Aparelhos ortodônticos e contenções fixas são fatores retentivos de placa dentária, pois dificultam a limpeza dos elementos dentários, favorecendo um maior acúmulo de biofilme e impedindo sua desestabilização, o que irá levar uma disbiose e corrupção desse microbioma por bactérias acidogênicas, acidúricas e microrganismos gram-negativos favorecendo o processo de cariogênese, gengivite e posteriormente doença periodontal com a reabsorção óssea, fruto da inflamação crônica tecidual (Furtado Júnior *et al.*, 2020; Lotif *et al.*, 2022; Siqueira *et al.*, 2021).

Já está bem documentada a ação da *P. granatum* Linné frente a microrganismo orais relacionados a condições patológicas como cárie dentária, gengivite e doença periodontal (*S. mutans*, *Prevotella* spp., *Selenomonas* spp., *T. denticola*, *P. gingivalis* e *T. forsythia*), além do seu marcante efeito anti-inflamatório por conta dos flavonoides e compostos fenólicos presentes no seu fitocomplexo (Carvalho Neto *et al.*, 2021; Eghbali *et al.*, 2021; Mallya *et al.*, 2019; Mishra *et al.*, 2019; Somu *et al.*, 2012).

Dessa forma, auxiliar no controle da população microbiana se torna uma estratégia adjuvante relevante para uma ação preventiva na doença cárie, gengivite e doença periodontal em pacientes que utilizam aparelhos ortodônticos e contenções fixas, além da melhoria de condições inflamatórias presentes nas doenças gengivais e do tecido de sustentação (Furtado Júnior *et al.*, 2020; Lotif *et al.*, 2022; Rodrigues Neto *et al.*, 2020).

As pastilhas mastigáveis incorporadas com *P. granatum* Linné 6,25% apresentaram um perfil de segurança satisfatório, uma vez que os participantes não relataram efeitos adversos ao uso, apresentando um *score 0* no algoritmo de Naranjo. O resultado apresentado se encontra dentro do esperado, uma vez que a *P. granatum* Linné é um alimento amplamente empregado na dieta, na produção de doces e balas, assim como produto natural com propriedade medicinal vastamente usado pela

população. Outros estudos corroboram com os dados encontrado relatando a ausência de efeitos adversos ao uso da *P. granatum* Linné na forma de dentifrício, colutório, gel oral e solução de irrigação de canais radiculares e gengival (Carvalho Neto *et al.*, 2021; Eghbali *et al.*, 2021; Eltay *et al.*, 2021; Mallya *et al.*, 2019; Mishra *et al.*, 2019; Somu *et al.*, 2012).

O uso da pastilha mastigável contendo *P. granatum* Linné 6,25% apresentou efeito positivo na redução do número de microrganismos gram-negativos presentes na saliva dos participantes do estudo, na qual não foi evidenciado crescimento microbiano no pós-tratamento. Essa redução foi significativa quando comparado o pré e pós-tratamento, assim como quando comparado com o tratamento placebo (pastilha sem ativos) ($p < 0,05$). No caso do *S. mutans* houve uma redução também do número de microrganismos tanto no pós-tratamento como quando comparada com o tratamento placebo ($p < 0,05$). Possivelmente, o uso por um período mais prolongado das pastilhas contendo romã possam impactar ainda mais na redução do crescimento microbiano, não só de *S. mutans* como também de uma maior diversidade de bactérias presentes na microbiota, como em outros estudos semelhantes utilizando produtos farmacêuticos a base de *P. granatum* Linné.

Esses dados corroboram com ensaio clínico realizado, com 80 crianças de 8 a 15 anos, no qual foram testados diferentes colutórios à base de produtos naturais por 30 dias. Ao final do estudo foi possível verificar que o colutório à base de *P. granatum* Linné foi capaz de reduzir o número de *S. mutans* salivares no D16 e D31, sendo superior ao controle positivo do estudo (colutório de clorexidina 0,12%). Nesse estudo também foi verificado que o grupo tratado com o colutório de romã apresentou uma redução significativa no índice de placa dentária, superior ao grupo controle positivo (Mishra *et al.*, 2019).

Outro ensaio clínico foi realizado utilizando gel de *P. granatum* Linné no tratamento de gengivite de 40 participantes tratados por 21 dias. Na conclusão do estudo verificou-se que os participantes tratados com o gel de romã apresentaram uma melhora no índice de sangramento gengival e redução do número de microrganismos gram-negativos (Cocos e bacilos) presentes na saliva em D7, D14 e se mantendo em D21. Entretanto, os melhores resultados do estudo foram alcançados nos participantes que foram tratados com raspagem e alisamento radicular associado com o gel de romã, evidenciando a importância da associação das terapias clássicas com os métodos adjuvantes (Somu *et al.*, 2012).

Um estudo *in vitro* testou a ação de colutórios de *P. granatum* Linné com ou sem associação com nitrato de prata nanoparticulado em *S. mutans* salivares e bacilos gram-positivos isolados da placa dentária dos participantes (*Lysinibacillus cresolivorans*, *Lysinibacillus cresolivorans* e *Lysinibacillus boronitolerans*). Os colutórios que continha associação com prata nanoparticulada apresentaram resultados superiores na formação do halo de inibição de crescimento com os microrganismos testados e no teste de concentração inibitória mínima. Além disso, o colutório incorporado com extrato metanólico e nanopartículas de prata foi capaz de solubilizar o cálculo dentário de maneira mais eficaz e todos os colutórios testados associados ou não com prata apresentaram ação anti-hemorrágica, o que era esperado, principalmente por conta dos taninos presentes no fitocomplexo presente nos extratos de *P. granatum* Linné (Esawy *et al.*, 2019).

Outro estudo *in vitro* avaliou a ação antimicrobiana do extrato aquoso de *P. granatum* Linné 20% isolado ou associação frente a *Enterococcus faecalis* (gram-negativo) na perspectiva de um novo material irrigador de canais radiculares. Foi verificado que o extrato de romã apresentou resultado semelhante a clorexidina 0,2% no halo de inibição, entretanto a associação romã + clorexidina e romã + hipoclorito 2,5% apresentaram halos de inibição maiores (Mallya *et al.*, 2019).

Em outro estudo diversos extratos vegetais brutos [*Caesalpinia ferrea* Mart. (Jucá), *Cinnamomum cassia* B. (Canela), *Mallow sylvestris* L. (*Mallow*), *P. granatum* L. (Romã), *Rosmarinus officinalis* L. (Alecrim), *Aeolanthus suaveolens* (Als.) Spreng. (Macassá), *Syzygium aromaticum* L. (Cravo) e *Tamarindus indica* L. (Tamarindo)] foram testados *in vitro* frente a microrganismos orais (*Fusobacterium nucleatum*, *Porphyromonas gingivalis*, *Prevotella intermedia* e *Parvimonas micra*). Verificou-se que o extrato de romã foi o único que inibiu o crescimento de todos os microrganismos testados, apresentando o maior teor de polifenóis e gerou a menor produção de compostos sulfurados voláteis, juntamente com o extrato de jucá, esses compostos são relacionados a halitose (Veloso *et al.*, 2020).

Um ensaio clínico controlado, duplo cego e registrado avaliou a eficiência da irrigação gengival com extrato *P. granatum* Linné 5% no tratamento da gengivite. Participaram do estudo 34 pacientes com gengivite crônica, sendo acompanhados por quatro semanas. Os participantes eram tratados com a raspagem e alisamento radicular e em seguida tinham a região irrigada com o extrato ou o placebo. Ao fim do estudo foi verificada diminuição do índice de placa e do índice gengival e melhora nos

níveis de interleucina-1 β . Mais uma vez se verifica a importância da associação da terapêutica clássica com produtos naturais adjuvantes (Eltay *et al.*, 2021).

Num outro estudo *in vitro* foi analisada a atividade anticariogênica e anti-inflamatória de um colutório de *P. granatum* Linné associado. A melhor formulação foi romã 3%, trimetafosfato de sódio 0,3% e fluoreto (225 ppm). Foi verificada diminuição do biofilme formado por *S. mutans* -13% (tratado por 1 min.) e 36% (tratado por 10 min.) e 26% (1 min.) e 36% (10 min.) do biofilme em *C. albicans*. Além disso, a ação anti-inflamatória foi confirmada pela redução da produção de interleucina-6 em macrófagos de camundongos (Fernandes *et al.*, 2022).

Apesar de demonstrar uma redução inferior na carga microbiana de *S. mutans* quando comparada com microrganismos gram negativos a partilha demonstra resultados promissores que podem ter efeito cumulativos com seu uso por período mais prolongado de modo semelhante a outros estudos, necessitando assim, de uma abordagem mais longitudinal.

Nesse contexto, verifica-se que a veiculação do extrato de *P. granatum* Linné numa pastilha mastigável pode ser uma estratégia acessível, de baixo custo, boa adesão e viável como adjuvante na prevenção da cárie dentária, gengivite e doença periodontal; assim como pode ser associada as terapias clássicas como os fluoretos e o tratamento periodontal de raspagem e alisamento radicular para o manejo clínico dessas condições. É importante ressaltar que essas estratégias sempre devem ser associadas aos cuidados de higiene oral, que ainda são o modo mais eficaz de prevenção.

7 CONCLUSÃO

Pastilhas mastigáveis contendo *P. granatum* Linné 6,25% foram capazes de reduzir a carga de *S. mutans* e eliminar a carga de microrganismos gram-negativos salivares.

A pastilha mastigável demonstrou segurança pelo fato de nenhum participante apresentar efeitos adversos.

Esse ensaio clínico piloto apresentou resultados promissores, podendo ser utilizadas no tratamento de gengivites e doenças periodontais.

8 PERSPECTIVAS

Novos estudos devem ser realizados com um maior tempo de acompanhamento e maior população.

Os efeitos poderão ser potencializados pela associação do extrato de *P. granatum* Linné 6,25% com clorexidina ou hipoclorito 2,5% ou mesmo com o uso de outros produtos naturais, como a água de coco em pó.

A adição de fluoretos também é indicada visando aumentar a remineralização dos dentes.

Outras apresentações farmacêuticas deverão ser desenvolvidas para ofertar maiores opções de uso aos profissionais de saúde bucal e à população em geral.

REFERÊNCIAS

- ANDRADE, D. R. *et al.* Subgingival microbiota in overweight and obese young adults with no destructive periodontal disease. **Journal of Periodontology**, [s. l.], v. 92, n. 10, p. 1410-1419, out. 2021.
- BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Atenção à Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. **SB Brasil 2010 – Pesquisa Nacional de Saúde Bucal: resultados principais**. Brasília: Ministério da Saúde, 2012.
- CAGETTI, M. G. *et al.* Effect of a toothpaste containing triclosan, cetylpyridinium chloride, and essential oils on gingival status in schoolchildren: a randomized clinical pilot study. **Quintessence International**, [s. l.], v. 46, n. 5, p. 1-10, maio 2015.
- CARVALHO NETO, G. L. *et al.* Mechanical brushing effects *in vitro* of a dentifrice containing *Punica granatum* Linné. **Journal of Young Pharmacists**, [s. l.], v. 13, n. 1, p. 54-59, jan. 2021.
- CURTIS, M. A.; DIAZ, P. I.; VAN DYKE, T. E. The role of the microbiota in periodontal disease. **Periodontology**, [s. l.], v. 83, n. 1, p. 14-25, jan. 2020.
- EGHBALI, S. *et al.* Therapeutic effects of *Punica granatum* (pomegranate): an updated review of clinical trials. **Journal of Nutrition and Metabolism**, [s. l.], v. 2021 297162-5297162, 2021.
- ELTAY, E. G. *et al.* *Punica granatum* peel extract as adjunct irrigation to nonsurgical treatment of chronic gingivitis. **Complementary Therapies in Clinical Practice**, v. 43, n. 5, p. 1-10, maio 2021.
- ESAWY, M. A. *et al.* Evaluated bioactive component extracted from *Punica granatum* peel and its Ag NPs forms as mouthwash against dental plaque. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, [s. l.], v. 18, n. 1, p. 1-12, jan. 2019.
- FERNANDES, G. L. *et al.* Pomegranate extract potentiates the anti-demineralizing, anti-biofilm, and anti-inflammatory actions of non-alcoholic mouthwash when associated with sodium-fluoride trimetaphosphate. **Antibiotics**, [s. l.], v. 11, n. 11, p. 14-29, nov. 2022.
- FRAGA, E. G. S. *et al.* Evaluation of chewing gums containing natural products on salivary concentrations of *Streptococcus mutans* in children. **Journal of Young Pharmacists**, [s. l.], v. 15, n. 1, p. 182-188, jan. 2023.
- FRAGA, E. G. S. *et al.* Xylitol, a promising allied for oral health. **Journal of Young Pharmacists**, [s. l.], v. 12, n. 3, p. 197-208, mar. 2020.
- FURTADO JÚNIOR, J. H. C. *et al.* Clinical and microbiological evaluation of Brazilian red propolis containing-dentifrice in orthodontic patients: a randomized clinical trial. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, [s. l.], v. 2020, n. 1, p. 1-7, jan. 2020.

- FURTADO JÚNIOR, J. H. C. *et al.* Propolis and its dental applications: a technological prospection. **Recent patentes on biotechnology**, [s. l.], v. 12, n. 4, p. 288-296, abr. 2018.
- GHALAYANI, P. *et al.* The efficacy of *Punica granatum* extract in the management of recurrent aphthous stomatitis. **Journal of Research in Pharmacy Practice**, [s. l.], v. 2, n. 2, p. 88-99, fev. 2013.
- GIRÃO JÚNIOR, F. J. *et al.* Salivary fluoride bioavailability after brushing with Brazilian red propolis dentifrice: a clinical study. **Evidence-based Complementary and Alternative Medicine: eCAM**, [s. l.], v. 31, n. 1, p. 1-6, jan. 2022.
- GRAVES, D. T.; DING, Z.; YANG, Y. The impact of diabetes on periodontal diseases. **Periodontology**, [s. l.], v. 82, n. 1, p. 214-224, jan. 2020.
- HANCOCK, S.; ZINN, C.; SCHOFIELD, G. The consumption of processed sugar-and starch-containing foods, and dental caries: a systematic review. **European Journal of Oral Sciences**, [s. l.], v. 128, n. 6, p. 467-475, jun. 2020.
- LICCARDO, D. *et al.* Periodontal disease: a risk factor for diabetes and cardiovascular disease. **International Journal of Molecular Sciences**, [s. l.], v. 20, n. 6, p. 1-14, jun. 2019.
- LOPES, R. M. *et al.* Enamel surface loss after erosive and abrasive cycling with different periods of immersion in human saliva. **Archives of Oral Biology**, [s. l.], v. 109, n. 1, p. 1-10, jan. 2020.
- LOTIF, M. A. L. *et al.* A double-blind randomized clinical trial of Brazilian red propolis dentifrice efficacy in orthodontic patients. **Journal of Oral Science**, [s. l.], v. 64, n. 1, p. 28-32, jan. 2022.
- MAKI, Y. *et al.* Monitoring caries risks before the window of infection and later caries increment: a caries prediction study on rapid detection of *Streptococcus mutans* using monoclonal antibodies. **The Bulletin of Tokyo Dental College**, [s. l.], v. 55, n. 1, p. 19-23, jan. 2014.
- MALLYA, L. *et al.* Evaluation of the antimicrobial efficacy of 20% *Punica granatum*, 0.2% chlorhexidine gluconate, and 2.5% sodium hypochlorite used alone or in combinations against *Enterococcus faecalis*: an in-vitro study. **Journal of Conservative Dentistry: JCD**, [s. l.], v. 22, n. 4, p. 367-375, abr. 2019.
- MIRA, A.; SIMON-SORO, A.; CURTIS, M. A. Role of microbial communities in the pathogenesis of periodontal diseases and caries. **Journal of Clinical Periodontology**, [s. l.], v. 44, n. 18, p. 23-38, jan. 2017.
- MISHRA, P. *et al.* Comparison of *Punica granatum*, *Terminalia chebula*, and *Vitis vinifera* seed extracts used as mouth rinse on salivary *Streptococcus mutans* levels in children. **The Journal of Contemporary Dental Practice**, [s. l.], v. 20, n. 8, p. 920-927, ago. 2019.

MOHAMMAD, S. M. *et al.* Chemical composition of the plant *Punica granatum* L. (Pomegranate) and its effect on heart and cancer. **Journal of Medicinal Plants Research**, [s. l.], v. 6, n. 40, p. 5306-5310, dez. 2012.

NYVAD, B.; TAKAHASHI, N. Integrated hypothesis of dental caries and periodontal diseases. **Journal of Oral Microbiology**, [s. l.], v. 12, n. 1, p. 1-13, jan. 2020.

PARSAEYAN, N.; MOZAFFARI-KHOSRAVI, H.; MOZAYAN, M. R. Effect of pomegranate juice on paraoxonase enzyme activity in patients with type 2 diabetes. **Journal of Diabetes & Metabolic Disorders**, [s. l.], v. 11, n. 1, p. 1-4, jan. 2012.

PRASAD, D.; KUNNAIAH, R. *Punica granatum*: A review on its potential role in treating periodontal disease. **Journal of Indian Society of Periodontology**, [s. l.], v. 18, n. 4, p. 428-436, abr. 2014.

RODRIGUES NETO, E. M. *et al.* Antimicrobial efficacy of propolis-containing varnish in children: a randomized and double-blind clinical trial. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, [s. l.], v. 2021, n. 1, p. 1-6, jan. 2021.

RODRIGUES NETO, E. M. *et al.* Dose-response evaluation of propolis dental varnish in children: a randomized control study. **Recent Patents on Biotechnology**, [s. l.], v. 14, n. 1, p. 41-48, jan. 2019.

ROSIER, B. T. *et al.* A single dose of nitrate increases resilience against acidification derived from sugar fermentation by the oral microbiome. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**, [s. l.], v. 11, n. 6, p. 1-6, jun. 2021.

SAMPAIO, F. C. *et al.* Dental caries prevalence, prospects, and challenges for Latin America and Caribbean countries: a summary and final recommendations from a Regional Consensus. **Brazilian Oral Research**, [s. l.], v. 35, n. 1, p. 1-15, jan. 2021.

SASTRAVAHA, G. *et al.* Adjunctive periodontal treatment with *Centella asiatica* and *Punica granatum* extracts: a preliminary study. **Journal of the International Academy of Periodontology**, [s. l.], v. 5, n. 4, p. 106-115, abr. 2003.

SASTRAVAHA, G. *et al.* Adjunctive periodontal treatment with *Centella asiatica* and *Punica granatum* extracts in supportive periodontal therapy. **Journal of the International Academy of Periodontology**, [s. l.], v. 7, n. 3, p. 70-79, mar. 2005.

SILVA, M. A. *et al.* Perception and adverse effects of patients after using propolis-containing dentifrice. **Journal of Young Pharmacists**, [s. l.], v. 11, n. 4, p. 421-430, abr. 2019.

SIMÓN-SORO, A.; MIRA, A. Solving the etiology of dental caries. **Trends in Microbiology**, [s. l.], v. 23, n. 2, p. 76-82, fev. 2015.

SIQUEIRA, É. C. *et al.* Evaluation of the effects of propolis and xylitol chewable tablets on the salivary concentrations of oral micro-organisms in orthodontic patients: A pilot study. **Journal of Young Pharmacists**, [s. l.], v. 13, n. 1, p. 68-76, jan. 2021.

SOMU, C. A. *et al.* Efficacy of an herbal extract gel in the treatment of gingivitis: A clinical study. **Journal of Ayurveda and Integrative Medicine**, [s. l.], v. 3, n. 2, p. 85-90, jun. 2012.

THOTAMBAILU, A. M.; BHANDARY, B. S. K.; SHARMILA, K. P. Protective effect of *Punica granatum* extract in head and neck cancer patients undergoing radiotherapy. **Indian Journal of Otolaryngology and Head & Neck Surgery**, [s. l.], v. 71, n. 1, p. 318-320, out. 2019.

USUI, M. *et al.* Mechanism of alveolar bone destruction in periodontitis - Periodontal bacteria and inflammation. **Japanese Dental Science Review**, [s. l.], v. 57, n. 11, p. 201-208, nov. 2021.

VALADAS, L. A. R. *et al.* Clinical and antimicrobial evaluation of *Copaifera langsdorffii* desf. Dental varnish in children: a clinical study. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine – Ecam**, [s. l.], v. 2021, n. 3, p. 1-9, mar. 2021.

VALADAS, L. A. R. *et al.* *Camellia sinensis* in dentistry: technological prospection and scientific evidence. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine – Ecam**, [s. l.], v. 2021, n. 8, p. 1-11, ago. 2021.

VALADAS, L. A. R. *et al.* Dose-response evaluation of a copaiba-containing varnish against *Streptococcus mutans* *in vivo*. **Saudi Pharmaceutical Journal**, [s. l.], v. 27, n. 3, p. 363-367, mar. 2019.

VASCONCELOS, C. S. *et al.* Use of *Punica granatum* as an antifungal agent against candidiasis associated with denture stomatitis. **Mycoses**, [s. l.], v. 46, n. 6, p. 192-196, jun. 2003.

VELOSO, D. J. *et al.* Potential antibacterial and anti-halitosis activity of medicinal plants against oral bacteria. **Archives of Oral Biology**, [s. l.], v. 110, n. 2, p. 1-7, fev. 2020.

WALSH, T.; OLIVEIRA-NETO, J. M.; MOORE, D. Chlorhexidine treatment for the prevention of dental caries in children and adolescents. **Cochrane Database of Systematic Reviews**, [s. l.], v. 2015, n. 4, p. 1-6, abr. 2015.

WANG, X. *et al.* Dental caries thresholds among adolescents in England, Wales, and Northern Ireland, 2013 at 12, and 15 years: implications for epidemiology and clinical care. **BMC Oral Health**, [s. l.], v. 21, n. 1, p. 1-14, jan. 2021.

APÊNDICE A – TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Prezado Senhor (a),

O Prof. Dr. Edilson Martins Rodrigues Neto, Farmacêutico (CRF 4663) e Cirurgião-Dentista (CRO 14336) está realizando um estudo sobre a **AVALIAÇÃO DO USO DE PASTILHA MASTIGÁVEL CONTENDO PRODUTOS NATURAIS SOBRE AS CONCENTRAÇÕES SALIVARES DE MICRORGANISMOS ORAIS EM PACIENTES ORTODÔNTICOS: UM ESTUDO CLÍNICO** e gostaria de convidar você para participar dessa pesquisa.

Este estudo tem como objetivo, avaliar uma pastilha mastigável a base de produtos naturais na redução de microrganismos cariogênicos em amostras de saliva extraídas da cavidade oral de voluntários adultos que fazem uso de aparelho ortodôntico. Os voluntários serão divididos aleatoriamente em grupos. Em todos os voluntários serão realizadas a utilização das pastilhas contendo os ativos ou placebo.

Seu benefício em participar do estudo será receber um cuidado especial com a saúde bucal, os resultados desse estudo vão contribuir para o aprendizado dos fatores responsáveis pela doença cárie e para o estudo dos medicamentos que sejam capazes de “paralisar/estabilizar” o desenvolvimento da cárie.

Não há efeitos colaterais aos materiais pelos pacientes envolvidos nesta pesquisa, porém, qualquer problema, com os voluntários deverão entrar em contato com a responsável pela pesquisa, na Rua Juvêncio Alves, 660, Centro, Quixadá – CE ou pelo telefone (85) 999614168. O responsável pela pesquisa também está à disposição para o esclarecimento de eventuais dúvidas que surgirem no decorrer da pesquisa. Você pode ainda entrar em contato com o Comitê de Ética em Pesquisa (CEP): R. Juvêncio Alves, 660 - Centro, Quixadá – CE, (88) 3412-6700.

As informações fornecidas serão confidenciais e de conhecimento apenas dos pesquisadores responsáveis. Os sujeitos da pesquisa não serão identificados

em nenhum momento, mesmo quando os resultados desta pesquisa forem divulgados em qualquer forma. O responsável poderá desistir de participar da pesquisa a qualquer momento, sem nenhuma penalidade, sem perder nenhum benefício e continuarão recebendo atendimento preventivo e encaminhamento para tratamento na Clínica de Odontologia da UNICATÓLICA.

O responsável autoriza a reutilização de dados coletados pela pesquisadora em outras pesquisas:

- () Não AUTORIZO a utilização de dados em outra pesquisa.
- () SIM AUTORIZO a utilização de dados em outra pesquisa

E para utilizar os dados em outra pesquisa o sujeito da pesquisa quer ser consultado:

- () NÃO quero ser consultado da utilização dos meus em outra pesquisa, desde que a nova pesquisa seja aprovada pelo Comitê de Ética em pesquisa.
- () SIM quero ser consultado da utilização dos meus em outra pesquisa.

Não haverá despesas pessoais para o participante em qualquer fase do estudo, incluindo exames e consultas. Também não haverá compensação financeira relacionada à sua participação.

Em caso de dano pessoal, diretamente causado pelos procedimentos ou tratamento proposto neste estudo, o participante tem o direito a tratamento odontológico na instituição, bem como as indenizações legalmente estabelecidas.

Declaração do Voluntário:

Eu, _____ RG: _____

Voluntário fui informado do estudo e de forma livre e voluntária (o), permito minha participação no estudo. Li e compreendi este termo de consentimento livre e esclarecido, bem como tive oportunidade de realizar questionamentos e esclarecer dúvidas. Declaro que concordo minha participação da pesquisa por livre e espontânea vontade, sem qualquer despesa de minha parte, mas sem qualquer tipo de reembolso por esta participação. Também autorizo a publicação dos dados obtidos por meio deste estudo, bem como declaro ter recebido uma cópia datada e assinada desse termo de consentimento

APÊNDICE B – FICHA DE ANAMNESE DADOS PESSOAIS E EXAME DENTÁRIO
FICHA ANAMNESE

Nome: _____

Idade: _____ Sexo: _____ Etnia: _____

Nascimento: _____

Naturalidade: _____ UF: _____

Nacionalidade: _____

Endereço: _____

Bairro: _____ CEP: _____ Fone: _____

Nome do Pai: _____ RG: _____

Nome da mãe: _____ RG: _____

Anamnese

Há algum problema de Saúde? () Sim () Não

Qual? _____

Medicamentos _____ em

uso: _____

Qual: _____

Tem alguma alergia: () Sim () Não

Qual: _____

Já foi ao dentista: () Sim () Não

Quando: _____

Hábitos de Higiene

Escova os dentes: () Sim () Não

Quantas vezes? _____

Usa fio dental? () Sim () Não

Declaro que as respostas acima são verdadeiras.

Quixadá, _____ de _____ de 20_____

Assinatura do Responsável

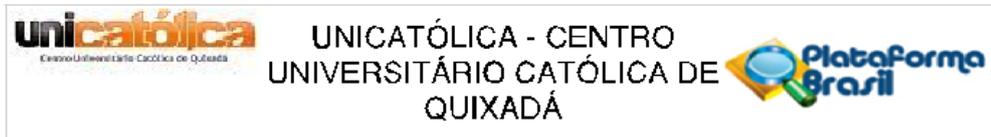
Assinatura do Responsável pelo estudo

APÊNDICE C – ALGORITMO DE NARANJO

Algoritmo de Naranjo

Questões	Sim	Não	Desconhecido
1. Existem notificações conclusivas sobre esta reação?	1	0	0
2. A reação apareceu após a administração do fármaco suspeito?	0	-1	0
3. A reação desapareceu quando o fármaco suspeito foi suspenso?	0	0	0
4. A reação reapareceu quando o fármaco foi readministrado?	0	-1	0
5. Existem causas alternativas (outro fármaco)?	-1	0	0
6. A reação aparece com a introdução do placebo?	-1	1	0
7. A concentração plasmática do fármaco está em nível tóxico?	0	0	0
8. A reação aumentou com dose maior ou reduziu com dose menor?	0	0	0
9. O paciente tem história de reação semelhante com o mesmo fármaco ou similar?	1	0	0
10. A reação foi confirmada por qualquer evidência objetiva?	1	0	0
Somatória			Causa
9 ou +			Definida
5 a 8			Provável
1 a 4			Possível
0			Duvidosa

ANEXO A – PARECER DO CEP



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: AVALIAÇÃO DE PASTILHAS MASTIGÁVEIS CONTENDO PRODUTOS NATURAIS NAS CONCENTRAÇÕES SALIVARES DE MICROORGANISMOS ORAIS

Pesquisador: EDILSON MARTINS RODRIGUES NETO

Área Temática:

Versão: 1

CAAE: 29690619.4.0000.5046

Instituição Proponente: ASSOCIAÇÃO EDUCACIONAL E CULTURAL DE QUIXADA

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

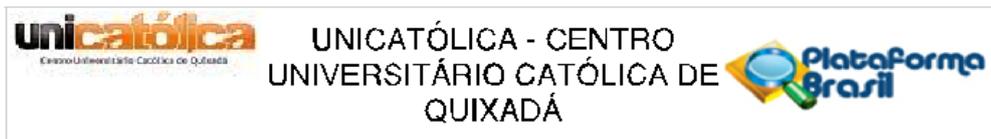
DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 3.935.708

Apresentação do Projeto:

A indústria tem mostrado nos últimos anos interesse por produtos naturais, devido ao baixo custo de produção, as fontes serem renováveis, não tóxico, no caso o amido, o xilitol, a Romã, a Própolis e Flúor são tipos de matéria-prima visadas pela indústria, pois são promissoras a para a produção pastilhas mastigáveis. Este trabalho tem como objetivo avaliar a ação de pastilhas mastigáveis a base Própolis Vermelha, Romã, Xilitol e Flúor nas concentrações de microorganismo orais presentes em salivas de adultos de 18 a 30 anos que não apresentam cárie e que tenham procurado atendimento na Farmácia Universitária da Unicatólica (Farmácia Universitária Irmã Dulce) e a pesquisa será realizada no período de outubro a novembro de 2019, mas no seguinte trabalho existem critérios de inclusão, como por exemplo: Voluntários que não tenham se submetido a tratamento odontológico durante os últimos seis meses. E critérios de exclusão, como por exemplo: Voluntários com história de alergias (asma, urticária, rinite, sinusite). Então, serão determinadas as quantidades de microorganismo/ml de saliva de cada voluntário através da quantificação das Unidades Formadoras de Colônias por mililitro (UFC/ml) antes e após o uso da pastilha, serão comparados 5 grupos de adultos, livre de cáries, que

Endereço: Rua Juvêncio Alves, 660
Bairro: Centro **CEP:** 63.900-257
UF: CE **Município:** QUIXADA
Telefone: (88)3412-6700 **Fax:** (88)3412-6743 **E-mail:** cep@unicatolicaquixada.edu.br



Continuação do Parecer: 8.465.708

utilizarão a pastilha contendo Própolis Vermelha 2,5% + Xilitol 7,5% (Grupo I), contendo Romã 6,5% (Grupo II), Romã 6,5% + Xilitol 7,5% (Grupo III), Própolis Vermelha 2,5% + Flúor 0,01% (Grupo IV) e Grupo V sem ativos (placebo), será avaliada a segurança da pastilhas mastigáveis contendo ativos mediante a pesquisa de eventos adversos. Trata-se de um ensaio clínico randomizado, placebo controlado, transversal.

Objetivo da Pesquisa:

Avaliar a ação das pastilhas mastigáveis a base de produtos naturais e xilitol nas concentrações de microorganismo orais presentes em salivas de adultos de 18 a 30 anos que não apresentam cárie

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Riscos e Benefícios descritos.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Pesquisa em conformidade com a resolução 466/12.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Todos os termos apresentados.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

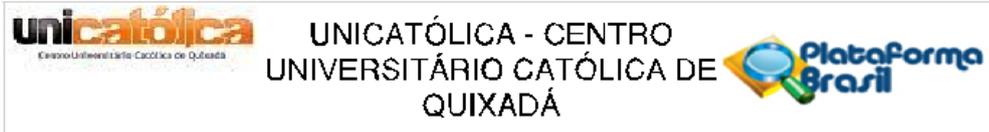
Aprovado.

Considerações Finais a critério do CEP:

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB INFORMAÇÕES BÁSICAS DO PROJETO_1456053.pdf	04/03/2020 11:18:38		Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	Projeto.pdf	04/03/2020 11:16:22	EDILSON MARTINS RODRIGUES NETO	Aceito
Outros	Anuencia.pdf	04/03/2020 11:11:17	EDILSON MARTINS RODRIGUES NETO	Aceito
Declaração de concordância	Concordancia.pdf	03/03/2020 16:23:47	EDILSON MARTINS RODRIGUES NETO	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de	TCLE.pdf	03/03/2020 16:22:50	EDILSON MARTINS RODRIGUES NETO	Aceito

Endereço: Rua Juvêncio Alves, 660
Bairro: Centro **CEP:** 63.900-257
UF: CE **Município:** QUIXADA
Telefone: (88)3412-6700 **Fax:** (88)3412-6743 **E-mail:** cep@unicatolicaquixada.edu.br



Continuação do Parecer: 8.465.70x

Ausência	TCLE.pdf	03/03/2020 16:22:50	EDILSON MARTINS RODRIGUES NETO	Aceito
Cronograma	CRONOGRAMA.pdf	27/02/2020 18:01:16	EDILSON MARTINS RODRIGUES NETO	Aceito
Orçamento	Orçamento.pdf	27/11/2019 11:35:02	EDILSON MARTINS RODRIGUES NETO	Aceito
Folha de Rosto	Rosto.pdf	27/11/2019 11:33:09	EDILSON MARTINS RODRIGUES NETO	Aceito

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

QUIXADA, 26 de Março de 2020

Assinado por:
Stânia Nágila Vasconcelos Carneiro
(Coordenador(a))

Endereço: Rua Juvêncio Alves, 660
Bairro: Centro **CEP:** 63.000-257
UF: CE **Município:** QUIXADA
Telefone: (88)3412-6700 **Fax:** (88)3412-6748 **E-mail:** cap@unicatolicaquixada.edu.br