

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE CAMPINA GRANDE
CENTRO DE SAÚDE E TECNOLOGIA RURAL
UNIDADE ACADÊMICA DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
CURSO DE ODONTOLOGIA**

CLARISSA DE MORAIS MARTINS NERI

**ESTUDO DOS EFEITOS TÓXICOS DOS TERPENOS ÁCIDO BETULÍNICO,
BETULINA E ÁCIDO OLEANÓLICO: UMA ABORDAGEM *IN SILICO***

PATOS-PB

2015

CLARISSA DE MORAIS MARTINS NERI

**ESTUDO DOS EFEITOS TÓXICOS DOS TERPENOS ÁCIDO BETULÍNICO,
BETULINA E ÁCIDO OLEANÓLICO: UMA ABORDAGEM *IN SILICO***

Trabalho de conclusão do curso (TCC) apresentado à coordenação do curso de Odontologia da Universidade Federal de Campina Grande – UFCG, como parte dos requisitos para obtenção do título de Bacharel em Odontologia.

Orientador: Prof. Dr. Abrahão Alves de Oliveira Filho

PATOS-PB

2015

CLARISSA DE MORAIS MARTINS NERI

**ESTUDO DOS EFEITOS TÓXICOS DOS TERPENOS ÁCIDO BETULÍNICO,
BETULINA E ÁCIDO OLEANÓLICO: UMA ABORDAGEM *IN SILICO***

Trabalho de Conclusão do Curso (TCC) apresentado à Coordenação do Curso de Odontologia da Universidade Federal de Campina Grande - UFCG, como parte dos requisitos para obtenção do título de Bacharel em Odontologia.

ORIENTADOR: Prof. Dr. Abrahão Alves de Oliveira Filho

Aprovado em ___/___/_____

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Abrahão Alves de Oliveira Filho – Orientador
Universidade Federal de Campina Grande

Prof^a. Dra. Maria Angélica Sátyro Gomes Alves – 1º Membro
Universidade Federal de Campina Grande

Prof. Msc. Ailton de Moraes Cavalcanti – 2º Membro

Dedico este trabalho a meus pais, José Costa Neri e Áurea Jelma de Moraes Neri, que sempre estiveram presentes ao meu lado, batalhando e acreditando na realização deste sonho.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus, pela dádiva da vida, por sempre se fazer presente ao meu lado, me dando força, conhecimento e paciência para concluir a jornada.

Aos meus Pais, Neri e Áurea, minha eterna gratidão, pela proteção, amor e apoio incondicional, e por acreditarem no meu sonho não mediram esforços durante todos esses anos para me proporcionarem sempre o melhor. Vocês são os melhores pais do mundo.

A meu Irmão Felipe, pelo apoio, amizade, companheirismo e acima de tudo pelo exemplo de caráter, superação e perseverança que fez com que eu me espelhasse a cada dia.

A minha cunhada e melhor amiga Rafaela, pelo carinho, pela confiança e pelo incentivo. Cada passo avançado tinha sempre certeza da sua torcida por mim.

A meu namorado Ailton, pela paciência, por ter sido companheiro, ajudando-me nos momentos que mais precisei, por todo conhecimento transmitido nos estágios e por ter sempre acreditado que juntos conseguiríamos. Você é mais do que pedi a Deus.

A meu orientador Prof. Abrahão por ter acreditado e me ajudado quando parecia impossível conseguir, serei eternamente grata pelo carinho e atenção que teve comigo durante todo o tempo.

A meu amigo Eduardo, que se fez presente todos os dias desses cinco anos. Ao seu lado a jornada se tornou mais fácil. Jamais me esquecerei de todos os momentos que vivemos juntos, você foi peça fundamental na realização desse sonho.

Aos parentes e amigos, em especial Vô Pedro, Luan, Alisson, Neude e Luiz que sempre torceram pela minha vitória.

A todos os funcionários e professores do curso de odontologia da UFCG, que sempre estiveram dispostos a ajudar, obrigada por todo conhecimento e exemplo que me forneceram durante todos esses anos. Em especial a professora Carolina Nóbrega, pela oportunidade da monitoria e do PIBIC.

A todos os meus colegas da turma 2010.2, que tornaram esses cinco anos mais divertidos. Poderia viver mil anos e não esqueceria tudo que vivemos juntos.

Aos meus pacientes que tanto contribuíram para minha formação.

"Não te mandei eu? Sê forte e corajoso; não temas, nem te espantes, porque o SENHOR, teu Deus, é contigo por onde quer que andares." Josué 1:9

RESUMO

Há tempos as plantas são usadas pela população com o objetivo de tratar e curar doenças. Na odontologia tem-se estimulado a avaliação de diferentes extratos de plantas para o controle do biofilme bucal. Os terpenos são metabólitos secundários que mediam interações importantes entre plantas e o meio ambiente. Vários terpenos são largamente utilizados na agricultura, alimentos e indústrias, e como um antisséptico geral na prática médica. Estudos têm mostrado que terpenos têm diversas propriedades farmacológicas incluindo antifúngico, antibacteriano, anti-inflamatória antioxidante e antiespasmódico. Logo, o presente estudo tem como objetivo avaliar o potencial tóxico de alguns desses terpenos, Ácido Betulínico, Betulina e Ácido oleanólico, utilizando modelos *in silico*. Ao se realizar a classificação metodológica desta pesquisa, pode-se perceber que se trata de um estudo aplicado, quantitativo e experimental. Todas as informações químicas dos terpenos selecionados foram obtidas no site <http://www.chemspider.com/>. Para a análise da toxicidade teórica foi submetido ao estudo *in silico* dos parâmetros ADMET usando o programa Osiris Property Explorer. Para a análise dos dados obtidos na pesquisa, utilizou-se o software Microsoft excel[®] 2010. Nos resultados encontrados no presente estudo, os três terpenos analisados, assim como a Clorexidina, não apresentaram nenhum potencial mutagênico, tumorigênico, irritante, como também não apresentaram danos ao sistema reprodutor sendo classificados na escala 1, significativa de dano ausente. Demonstrando assim, *in silico*, a segurança do uso destes compostos, no entanto, os testes clínicos são fundamentais para a comprovação destes resultados. Pode-se concluir que, assim como a Clorexidina, estes terpenos estão sendo descobertos para desenvolvimento de terapias alternativas na odontologia, e testes *in silico* são de extrema importância para verificar a qualidade destes novos compostos.

Palavras-chave: Biofilme bucal, Odontologia, Terpenos.

ABSTRACT

For a long time plants are used by population in order to treat and cure diseases. In dentistry it has encouraged the evaluation of different plant extracts for the oral biofilm control. Terpenes are secondary metabolites that mediate important interactions between plants and the environment. Many terpenes are widely used in agriculture, food and industries and as a general antiseptic in medical practice. Studies have shown that terpenes have several pharmacological properties including antifungal, antibacterial, anti-inflammatory, antioxidant and anti-spasmodic. Therefore, the present study aims to evaluate the potential toxicity of some of these terpenes, Betulinic Acid, Betulin and oleanolic acid, using *in silico* models. When performing the methodological classification of this research, we realized that it is an applied, quantitative and experimental study. All chemical information from the selected terpenes were obtained in the site <http://www.chemspider.com/>. For the analysis of theoretical toxicity it was submitted to the *in silico* study of ADMET parameters using the Osiris Property Explorer program. For the analysis of obtained data in the research it was used the software Microsoft Excel® 2010. On the results found in this study, the three analyzed terpenes, as well as chlorhexidine, showed no mutagenic, tumorigenic and irritating potentials, and also did not present damage to the reproductive system being classified on the scale 1, absent significant damage. Demonstrating, *in silico*, the safety of these compounds, however, clinical trials are crucial to prove these results. It can be concluded that, as well as Chlorhexidine, these terpenes are being discovered to develop alternative therapies in dentistry, and *in silico* tests are extremely important to check the quality of these new compounds.

Keywords: Oral Biofilm, Dentistry, Terpenes.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 - Etapas de formação do biofilme	17
Figura 2 - Estrutura química do Digluconato de Clorexidina	21
Figura 3 - Compostos terpenoides	23
Figura 4 - Estrutura química do ácido Betulínico.	24
Figura 5 - Estrutura química da betulina.	24
Figura 6 - Estrutura química do ácido oleanólico.	25

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1- Potencial Mutagênico dos terpenos em comparação com a clorexidina.....	41
Gráfico 2- Potencial Tumorigênico dos terpenos em comparação com a clorexidina	42
Gráfico 3- Nível de danos ao Sistema Reprodutor dos terpenos em comparação com a Clorexidina	43
Gráfico 4- Nível do Potencial Irritante dos terpenos em comparação com a Clorexidina	44

LISTA DE ABREVIACOES E SIGLAS

A.C	Antes de Cristo
AB	cido Betulínico
ADME	Absorção, Distribuição, Metabolismo e Excreção
C	Carbono
DNA	cido Desoxirribonuclicos
EBV-E	Vírus Epstein-Barr
S	<i>Streptococcus</i>
TCC	Trabalho de Conclusão de Curso
UFCG	Universidade Federal de Campina Grande

LISTA DE SÍMBOLOS

μm	Micrômetro
%	Porcentagem

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	13
2 REFERENCIAL TEÓRICO	15
2.1 O BIOFILME BUCAL	15
2.2 COMPOSIÇÃO E FORMAÇÃO DO BIOFILME	16
2.2.1 Película adquirida	17
2.2.2 Fase de Colonização Inicial	17
2.2.3 Proliferação microbiana e formação das microcolônias	18
2.2.4 Estruturação e maturação do biofilme	18
2.3 CONTROLE MÊCANICO/QUÍMICO DO BIOFILME	19
2.3.1 Clorexidina no controle do biofilme	20
2.3.2 Uso de fitoterápicos no controle químico do biofilme	21
2.4 TERPENÓIDES.....	22
2.4.1 Ácido betulínico	23
2.4.2 Betulina	24
2.4.3 Ácido oleanólico	24
2.5 ESTUDOS DA TOXICIDADE DE PLANTAS MEDICINAIS	25
2.6 ESTUDOS <i>IN SILICO</i>	26
REFERÊNCIAS	28
3 ARTIGO	34
4 CONSIDERAÇÕES FINAIS	48
ANEXO A- NORMAS PARA PUBLICAÇÃO NA REVISTA INTERDISCIPLINAR EM SAÚDE	49
ANEXO B- COMPROVANTE DE SUBMISSÃO DA REVISTA INTERDISCIPLINAR EM SAÚDE	50

1 INTRODUÇÃO

O conhecimento sobre a placa dental evoluiu significativamente desde a sua primeira observação, por van Leewenhoek, em 1684. Modernamente, a placa dental é reconhecida como um biofilme verdadeiro (WILDERER; CHARACKLIS, 1989), o qual pode ser definido como uma população microbiana aderida a um substrato orgânico ou inorgânico, estando envolvida por seus produtos extracelulares, os quais formam uma matriz intermicrobiana, podendo ocorrer na superfície de várias estruturas na natureza (SVENSÄTER, BERGENHOLTZ, 2004). Na boca, o biofilme é composto por micro-organismos sobre uma camada de proteína denominada película adquirida do esmalte, que é constituída por glicoproteínas salivares, fosfoproteínas, lipídeos e componentes do fluido gengival. (FEJERSKOV; KIDD, 2005).

Os micro-organismos presentes no biofilme podem se dividir em aeróbios, anaeróbios facultativos e anaeróbios estritos. Podem também ser divididos de acordo com a coloração apresentada, em Gram-positivos e Gram-negativos. (TRABULSI et al., 1999). O biofilme é academicamente classificado em supragengival e subgengival. A composição microbiana destes dois tipos difere no tipo e/ou proporção de espécies bacterianas, pois estas áreas estão sujeitas a diferentes condições ambientais, como por exemplo, disposição de nutrientes e exposição ao oxigênio. As espécies bacterianas mais comumente detectadas no biofilme são: *S. sanguis*, *S. mutans*, *S. oralis*, *S. mitis biovar 1 e 2*, *S. gordonii*, *S. salivarius*, *Actynomices naseslundii*, *Actynomices Odontolyticus*, *Neisseria sp.*, *Lactobacillus sp.*, *Veillonella sp.*, *Prevotella sp.*, *Haemophilus*, *Fusobacterium sp.*, *Eubacterium* e Bacterióides (NOGUEIRA et al., 2007; ALVES et al., 2010).

Muitos estudos demonstraram que o biofilme dental é o fator determinante da cárie dentária e doença periodontal, justificando a utilização de medidas para o seu controle (AXELSSON; LINDHE, 1974; KORNMAN, 1986), dentre elas, o controle mecânico do biofilme (escovação e uso do fio dental) é o mais aceito, e os agentes químicos têm sido utilizados como coadjuvantes da higiene bucal quando incorporados em soluções para bochecho (CURY, 2003). Há constante necessidade de se avaliar meios alternativos para o controle do biofilme. A fitoterapia pode ser mais um recurso dentro dos programas de prevenção e promoção em saúde bucal. Há tempos as plantas são usadas pela população com o objetivo de tratar e curar doenças (BUFFON, 2001). Com o importante crescimento mundial da fitoterapia dentro de programas preventivos e curativos tem-se estimulado a

avaliação da atividade de diferentes extratos de plantas para o controle do biofilme dental (LIMA et al, 2011).

A maioria destas terapias envolvem o uso de extratos de plantas ou seus compostos ativos, tais como os terpenos (WAGNER; ELMADFA, 2003). Segundo GLÓRIA (1994), os terpenos representam o grupo mais importante de substâncias químicas secretadas, sendo derivados do isopreno (unidade ramificada de cinco carbonos) e classificados de acordo com o número mínimo dessas unidades presentes na molécula. Os terpenos são metabólitos secundários, porque eles são classificados como não essencial para a sua viabilidade; no entanto, eles mediam interações importantes entre plantas e o meio ambiente (CHAPPELL, 1995). Vários terpenos são largamente utilizados na agricultura, alimentos e indústrias, e como um antisséptico geral na prática médica (AESCHBACH et al, 1994). Estudos têm mostrado que terpenos têm diversas propriedades farmacológicas incluindo antifúngico, antibacteriano, anti-inflamatória antioxidante e antiespasmódico (GARCIA et al, 2008; OTELHO et al., 2007; SANCHEZ et al., 2009; JULIÃO et al., 2003).

A utilização de terpenos pode exercer efeitos adversos no organismo, caracterizando assim um grave problema de saúde pública (REBOREDO et al., 2007). Estes efeitos, bem como a eventual ação sinérgica com outras drogas, são bastante comuns. Neste contexto, testes toxicológicos avaliam os efeitos do tratamento em muitos órgãos (CLARK, 1993). Estes parâmetros são usados para caracterizar doses, relações de resposta, e ajudar a selecionar as concentrações ideais utilizadas em tratamentos com essas substâncias (BARNES E DOURSON, 1998).

Sabendo-se da importância da descoberta de produtos naturais com efeitos terapêuticos, bem como, a possibilidade de efeitos tóxicos ao organismo causados pelos terpenos, torna-se relevante estudar o potencial toxicológico de alguns exemplos destes metabólitos secundários com propriedade antimicrobiana já relatada contra bactérias que compõem o biofilme bucal, como por exemplo, Ácido Betulínico, a Betulina, e o Ácido Oleanólico, avaliando o efeito mutagênico, tumoral, irritante e alterações no sistema reprodutor causados pelos mesmos e comparar os resultados com a Clorexidina, um agente antimicrobiano padrão utilizado na Odontologia, a fim de se confirmar a possibilidade de novas opções terapêuticas.

2. REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 O BIOFILME BUCAL

Na natureza, a maioria dos *habitats* comporta uma microbiota característica. A composição da microbiota é quase sempre uma mistura complexa de bactérias que se adaptaram e aí sobrevivem. Logo, os tipos de bactérias encontradas num determinado *habitat* refletem características desses ambientes, e qualquer alteração desse ambiente pode acarretar mudança de composição da microbiota ali instalada. A existência de superfícies é uma característica importante desses habitats, uma vez que fornecem áreas ricas em nutrientes e locais estáveis onde micro-organismos podem se aderir, iniciando assim um processo de colonização, processo esse bastante complexo em razão não só da interação das bactérias com o meio ambiente, mas também da interação entre as diversas espécies de bactérias que irão compor a colônia (THYLSTRUP, 1994).

A boca, como outras áreas de mucosas, possui uma microbiota natural, a qual se mantém em equilíbrio com os sistemas imunológicos, inatos e adaptativos do hospedeiro. A microbiota indígena comensal se desenvolve desde o nascimento e estimula a maturação do sistema imunológico. Uma vez estabelecida, se torna importante para a manutenção da saúde, pois age como uma barreira competitiva contra a infecção por micro-organismos patogênicos. Variações ambientais podem, no entanto, modificar a composição da microbiota natural e favorecer a infecção por micro-organismos patogênicos. A dieta do hospedeiro pode interferir na composição microbiana do biofilme bucal. A higiene bucal negligenciada também favorece o acúmulo microbiano na superfície dentária induzindo processos inflamatórios crônicos, os quais promovem danos aos tecidos bucais (MARSH, 1991).

Um evento que impede o desenvolvimento de colônias bacterianas é o processo natural de desprendimento de células da superfície da mucosa oral. Isso evita a formação de colônias bacterianas, no entanto, a cavidade bucal normalmente apresenta dois tipos de superfície para a colonização por bactérias: tecidos moles descamativos que favorecem esse desprendimento e superfícies duras do esmalte e dentina, que não apresentam essa característica descamativa, mas sim uma superfície dura propícia à adesão bacteriana. Isso favorece o acúmulo de grandes depósitos bacterianos, ricos tanto em número quanto em diversidade de micro-organismos. Esse acúmulo bacteriano, denominado placa bacteriana ou biofilme dental, é considerado o agente causador das duas patologias mais frequentes na cavidade oral: a cárie e a doença periodontal (LINDHE, 1997).

A placa dental pode ser definida como um aglomerado de bactérias aderidas aos tecidos duros e moles da boca, embebidas em uma matriz extracelular (polissacarídeos, exopolissacarídeos) e saliva (MARINHO; ARAÚJO, 2007). Hoje, a placa bacteriana, em uma nova visão, passou a ser chamada de biofilme após análises feitas na Conferência em Ecologia Microbiana. Biofilme é uma comunidade cooperativa, bem organizada, de células microbianas aderidas a uma superfície úmida e aglomerada por matriz de polissacarídeos (NASCIMENTO; COLS, 2006). Na boca, o biofilme é composto por micro-organismos sobre uma camada de proteína denominada película adquirida do esmalte, que é constituída por glicoproteínas salivares, fosfoproteínas, lipídeos e componentes do fluído gengival. O desenvolvimento do biofilme bucal pode ser dividido em vários estágios, sendo a primeira fase a formação da película e terminando com a formação da placa madura (FEJERSKOV; KIDD, 2005).

2.2 COMPOSIÇÃO E FORMAÇÃO DO BIOFILME

O biofilme pode ser composto por uma única espécie microbiana (monoespécie) ou por uma população mista de micro-organismos de espécies diferentes (multiespécie) considerado o mais comum. No biofilme multiespécie, vive um micronicho, no qual nutrientes podem ser obtidos a partir de espécies vizinhas. Os micro-organismos na face externa vivem em condições aeróbias, enquanto aqueles situados no interior vivem em condições anaeróbias (LOPES; SIQUEIRA, 1998). São observadas várias microcolônias de espécies distintas, caracterizando um processo de segregação. Entretanto, microcolônias de espécies coagregadas também podem existir. Logo, os micro-organismos presentes no biofilme podem se dividir em aeróbios, anaeróbios facultativos e anaeróbios estrictos. Podem também ser divididos de acordo com a coloração apresentada, em Gram-positivos e Gram-negativos (TRABULSI et al., 1999).

O biofilme é academicamente classificado em supragengival e subgengival. A composição microbiana destes dois tipos difere no tipo e/ou proporção de espécies bacterianas, pois estas áreas estão sujeitas a diferentes condições ambientais, o crescimento bacteriano e a formação de micronichos dependem da estrutura do biofilme, da atividade fisiológica das espécies vizinhas, da quantidade, da capacidade de difusão e do tipo de nutriente disponível (COSTERTON, 1994).

As espécies bacterianas mais comumente detectadas no biofilme são: *S. sanguis*, *S. oralis*, *S. mutans*, *S. mitis biovar 1 e 2*, *S. gordonii*, *S. salivarius*, *Actynomices naseslundii*,

Actynomices Odontolyticus, *Neisseria sp.*, *Lactobacillus sp.*, *Veillonella sp.*, *Prevotella sp.*, *Haemophilus*, *Fusobacterium sp.*, *Eubacterium e Bacterioides* (NOGUEIRA et al., 2007; ALVES et al., 2010).

2.2.1 Película adquirida

Uma estrutura associada ao biofilme bucal é a película adquirida do esmalte, um filme orgânico muito delgado (0,1 a 10 μm de espessura), acelular, constituído principalmente pela glicoproteína salivar ou mucina. Deposita-se diretamente sobre a superfície dos dentes, materiais restauradores e epitélio bucal (adsorção seletiva) e é rápida e seletivamente colonizada por algumas espécies bacterianas logo após sua deposição sobre o dente. A película adquirida tem a função de lubrificar e assim proteger a superfície do dente, reduzindo o atrito gerado pela mastigação. Além disso, impede o ressecamento da superfície do esmalte tornando-o menos friável, favorece sua reparação, interfere na seleção da aderência de bactérias ao dente, pois é um mecanismo dotado de alta especificidade bioquímica. (HAY, 1969; YAO et al., 2003)

Durante o desenvolvimento do biofilme, são reconhecidas diferentes etapas, logo, várias teorias têm sido propostas para explicar a formação do biofilme bucal. Entretanto, a teoria de desenvolvimento mais aceita obedece às seguintes etapas:

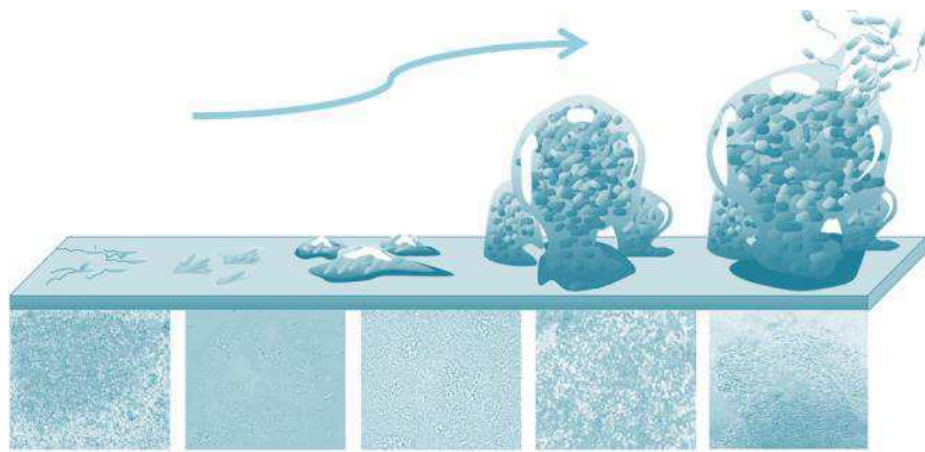


Figura 1- Etapas de formação do biofilme. Fonte: odontoup.com.br

2.2.2 Fase de Colonização Inicial

Esta etapa geralmente se processa no período de menos de uma hora a oito horas após a limpeza dos dentes. Caracteriza-se por interações bioquímicas específicas envolvendo adesinas geralmente presentes na superfície celular dos colonizadores iniciais e receptores presentes na glicoproteína salivar que recobre o dente. Os colonizadores iniciais (bactérias pioneiras) mais conhecidos são *Streptococcus sanguinis*, *S. oralis*, *S. gordonii*, *S. mitis*, *Actinomyces naeslundii*, *Fusobacterium nucleatum* e *Capnocytophaga ochraceae*. *S. mutans* e *S. sobrinus*, podem se implantar quando existir disponibilidade frequente de sacarose, portanto em função da dieta do hospedeiro (SOCRANSKY S, 2002).

Vários mecanismos participam dessa importante fase, na qual as adesinas dos colonizadores iniciais são reconhecidas, especificamente, por diversas moléculas receptoras presentes na película salivar depositada sobre os dentes. A firme aderência de bactérias à superfície dental revestida pela película salivar é o primeiro passo essencial para a formação do biofilme dental. Cabe destacar que, como regra, superfícies rugosas oferecem maior área para colonização bacteriana, maior proteção contra forças que tendem a desalojar as bactérias aderidas e maior dificuldade de remoção pela limpeza (SOCRANSKY S, 2002).

2.2.3 Proliferação microbiana e formação das microcolônias

No início, o biofilme é formado por monocamadas. Com o decorrer do tempo, multicamadas são observadas. O aumento do biofilme é devido ao acúmulo microbiano, que por sua vez é resultado do processo de divisão celular dos micro-organismos aderidos e da adsorção de novos micro-organismos. Os diversos mecanismos envolvidos nessa fase de acúmulo microbiano podem ser caracterizados como adesão e co-adesão, onde adesinas de novos micro-organismos se ligam a receptores da superfície celular dos micro-organismos que formam as primeiras camadas do biofilme. E agregação e co-agregação, no primeiro caso, bactérias da mesma espécie se unem para se ligar ao biofilme, e no segundo, é a junção de espécies diferentes que se juntam para se unirem ao biofilme. (SVENSATER; BERGENHOLTZ, 2004).

2.2.4 Estruturação e maturação do biofilme

A multiplicação dos micro-organismos, leva ao crescimento e forma uma superfície tridimensional e funcionalmente organizada. A produção de polímeros resulta na formação complexa de matriz extracelular, compondo glucanos solúveis e insolúveis, frutanos e heteropolímeros. Essa matriz pode ser biologicamente ativa, reter nutrientes, água e enzimas no biofilme oral. Os mecanismos de adaptação que os micro-organismos utilizam para sobreviver no biofilme incluem adaptação genética, mutação e recombinação genética e aquisição de novo material genético (transformação) ou regulação da expressão de material genético existente. (NASCIMENTO; COLS, 2006).

A flexibilidade na expressão genética bacteriana permite a sobrevivência em ambientes com condições instáveis, sendo as bactérias particularmente adaptáveis a quase todos os nichos ambientais do nosso planeta. As bactérias podem responder a sinais do meio ambiente e se destacarem da superfície, permitindo que colonizem outros locais (ROMEIRO; COLS, 2009).

2.3 CONTROLE MECÂNICO/QUÍMICO DO BIOFILME

Muitos estudos demonstraram que o biofilme dental é o fator determinante da cárie dentária e doença periodontal, justificando a utilização de medidas para o seu controle (ALVES et al., 2009, SILVA et al., 2008). O controle mecânico do biofilme (escovação e uso do fio dental) é o mais aceito, e os agentes químicos têm sido utilizados como coadjuvantes da higiene bucal quando incorporados em soluções para bochecho (CURY, 2003). Desse modo, substâncias antimicrobianas vêm sendo utilizadas para o controle químico do biofilme dental, como adjuvantes aos procedimentos mecânicos ou para afecções específicas (MONFRIN; RIBEIRO, 2000).

Existem algumas razões que justificam a utilização de agentes químicos para o controle do biofilme. Em indivíduos com boa higiene bucal e dieta pobre em sacarose, a simples presença do biofilme não é indicativa de patologias, pois ele pode ser formado por uma microbiota pouco patogênica (KRIGER, 1997), logo, os biofilmes relacionados com a doença periodontal estão associados com higiene bucal deficiente, assim as substâncias antibacterianas poderiam tentar compensar a desmotivação para uma boa limpeza dos dentes. Outras indicações para determinada terapia são em casos de pacientes com dificuldades operacionais frente ao controle mecânico, para pacientes sob o uso de aparelhos ortodônticos, no pré e pós-operatório de cirurgias ou em pacientes especiais (MATTOS, 2003).

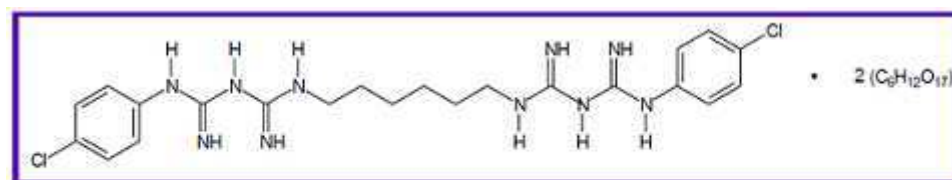
Diversas formas farmacêuticas são utilizadas para a liberação de agentes antimicrobianos na cavidade oral: pastilhas, vernizes, géis e soluções. Os colutórios ou enxaguatórios constituem as formas mais simples, sendo uma mistura do componente ativo, água, álcool, surfactantes e umectantes. Alguns fatores são desejáveis na escolha de uma substância para controle do biofilme bacteriano: ser atóxico, não alergênico e não irritante, além disso, possuir eficácia, com redução estatística e significativa do biofilme, especificidade, ou seja, afetar somente a flora patogênica, substantividade, através da retenção e lenta liberação do princípio ativo, sabor agradável, ausência de resistência induzida à droga e baixo custo (NEWBRUN, 1988). As substâncias antimicrobianas mais utilizadas sob a forma de enxaguatórios são: fluoreto de sódio, cloreto de cetilpiridínio, triclosan, timol e clorexidina, dentre outras (MONFRIN; RIBEIRO, 2000).

2.3.1 Clorexidina no controle do biofilme

Segundo Vinholis et al. (1996), A clorexidina é uma bisguanida catiônica, disponível principalmente na forma de sais de digluconato. É considerado um antisséptico de amplo espectro sobre as bactérias gram-positivas, gram-negativas, fungos e leveduras. Ela atua na formação da película adquirida, leva à diminuição significativa do biofilme, pois há alterações na aderência microbiana, aumento da permeabilidade celular com rompimento da bactéria ou coagulação e precipitação dos constituintes citoplasmáticos. Dentre os estudos ela apresentou melhores características como: substantividade de 12 horas, eficiência, estabilidade e segurança. É mais utilizada na forma de digluconato de clorexidina (Figura 2), em concentrações de 0,12%, 0,2% ou 2%. É considerada como substância “padrão ouro” no controle do biofilme dental (MENDES et al., 1995). Alguns efeitos colaterais são atribuídos ao uso oral da clorexidina em enxaguatórios decorrentes do uso prolongado: manchas acastanhadas nos dentes, em restaurações ou no dorso da língua, descamação e perda da sensibilidade oral, gosto amargo e a interferência na sensação gustativa. Embora existam, no mercado consumidor, enxaguatórios com concentração de 2%, a utilização de produtos com clorexidina a 0,12% é mais indicada, pois, nessa concentração, são diminuídos os efeitos adversos das soluções mais concentradas, mantendo-se a eficácia contra os micro-organismos (GEBRAN; GEBERT, 2002).

Diante das limitações desse agente, alguns produtos de origem vegetal são utilizados no controle do biofilme bucal com a vantagem de apresentarem efeitos colaterais reduzidos, sendo relatado apenas uma pequena ardência com possibilidade de erosão na mucosa, quando

comparados a produtos sintéticos. Além da ação terapêutica comprovada de muitas espécies, estas representam parte integrante da cultura de um povo, sendo um saber utilizado e difundido pelas populações ao longo do tempo (MORAN et al., 1992).



Digluconato de clorexidina

Figura 2 - Estrutura química do digluconato de clorexidina.

Fonte: esteriplas.net.

2.3.2 Uso de fitoterápicos no controle químico do biofilme

A fitoterapia é uma prática antiga, que remonta a manuscritos datados de 1.500 a.C (LIMA, 2006). Etimologicamente, vem das palavras gregas *phyton* (plantas) e *therapeia* (tratamento), ou seja, tratamento por meio das plantas (GUYOT, 1990). As plantas medicinais são capazes de fornecer fármacos extremamente importantes, dificilmente obtidos por síntese química, podendo ser levemente modificados, com tendência a serem mais eficazes, a possuírem menor potencial tóxico e a apresentarem efeito terapêutico semelhante quando comparados aos fármacos sintéticos (TUROLLA; NASCIMENTO, 2006).

A partir dos anos 1980, o interesse pelos fármacos de fontes naturais e extratos vegetais cresceu de maneira a impulsionar novas pesquisas, com o intuito de comprovar a eficácia da fitoterapêutica e de desenvolver novos fármacos. Contudo, o uso potencial de plantas como fonte de drogas é ainda pouco explorado. Apenas uma pequena porção das espécies de plantas estimadas tem sido investigada fitoquimicamente, e uma fração menor ainda têm suas propriedades farmacológicas estudadas. No Brasil, as plantas medicinais são amplamente usadas nas zonas rurais e urbanas. A maioria é usada de acordo com a tradição popular desenvolvidas pelos nativos ou trazidas para o país pelos europeus, africanos e asiáticos (RATES, 2001).

Os programas preventivos e curativos têm estimulado a avaliação dos extratos de plantas para o uso na odontologia como controle do biofilme dental e outras afecções bucais. Sendo assim, a odontologia é beneficiada pela riqueza em recursos naturais oferecidos pela

flora brasileira, pois os produtos naturais estão cada vez mais presentes nos consultórios médicos e odontológicos. (SOYAMA; OLIVEIRA, 2007).

Nesse sentido, as pesquisas com produtos naturais no meio odontológico têm aumentado nos últimos anos devido à busca por novos produtos com maior atividade terapêutica, com menor toxicidade e melhor biocompatibilidade, além de apresentarem custos mais acessíveis à população. Os compostos fitoterápicos podem ser utilizados nas mais variadas fórmulas, como cápsulas, comprimidos, géis, pomadas, soluções aquosas, soluções hidroalcoólicas e infusões, que são conhecidas como chás. A aceitação popular da fitoterapia leva a boas perspectivas no mercado de produtos odontológicos que contém substâncias naturais, e estes podem ser introduzidos desde que estudos laboratoriais e clínicos específicos comprovem sua eficácia (AGRA; OLIVEIRA, 2008).

Dentre os compostos com atividade antimicrobiana extraídos de plantas, estão os flavanoides, os taninos, os alcaloides, os terpenos e os óleos essenciais. (COWAN, 1999; ROMANO et al., 2013).

2.4 TERPENOIDES

Dentre os metabólitos secundários vegetais, os terpenoides, substâncias cuja origem biossintética deriva de unidades do isopreno, constituem o maior grupo. Os terpenos são constituintes que fazem parte da composição dos óleos essenciais, que por sua vez são empregados na indústria na produção de perfumes e cosméticos, além de apresentarem efeitos farmacológicos (EDRIS, 2007). Os compostos terpenoides têm sua origem biossintética das unidades do isopreno, que por sua vez é originado a partir do ácido mevalônico (SPITZER, 2004).

Os compostos terpênicos são divididos, de acordo com o número de carbono (C) em suas moléculas, em isoprenos ou hemiterpenos (5 C), monoterpenos (10 C), sesquiterpenos (15 C); diterpenos (20 C); sesterpenos (25 C); triterpenos (30 C); tetraterpenos (40 C) e polisoprenóides (n C) (Figura 3) (SPITZER, 2004; BAKKALI et al., 2008).

Os terpenos são metabólitos secundários, porque eles são classificados como não essencial para a sua viabilidade; no entanto, eles mediam interações importantes entre plantas e o meio ambiente (CHAPPELL, 1995). Vários terpenos são largamente utilizados na agricultura, alimentos e indústrias, e como um antisséptico geral na prática médica (AESCHBACH et al, 1994). Estudos têm mostrado que terpenos têm diversas propriedades

farmacológicas incluindo antifúngico, antibacteriano, anti-inflamatório antioxidante e antiespasmódico (GARCIA et al, 2008).

Nº de Unid.	Número de átomos de carbono	Nome ou classe
1	5	isopreno
2	10	monoterpenóides
3	15	sesquiterpenóides
4	20	diterpenóides
5	25	sesterpenos
6	30	triterpenóides
8	40	tetraterpenóides
n	n	polisoprenóides

Figura 3- Compostos Terpenoides. Fonte: SPITZER,2004

2.4.1 Ácido betulínico

O ácido betulínico (AB) é um triterpeno pentacíclico do tipo lupano amplamente distribuído no reino vegetal (Figura 4), presente em frutas e verduras. Suas fontes tradicionais são espécies europeias do gênero *Betula*, que produzem seu álcool precursor, a betulina (FRIGHETTO et al., 2005). Ele também está presente em inúmeras espécies tropicais, sendo extraído em grandes quantidades da casca de uma variedade de espécies de árvores, dentre elas a do gênero *Clusia* (FRIGHETTO et al., 2005; YOGEE SWARI; SRIRAM, 2005). Esse gênero engloba cerca de 250 espécies que ocorrem em regiões tropicais e subtropicais das Américas do sul e central (FARIAS et al., 2011).

Esse triterpeno apresenta uma variedade de atividades biológicas e farmacológicas, dentre elas podem citar-se as atividades antimalárica, antioxidante, anti-inflamatória que atuam na inibição das enzimas na rota do ácido araquidônico e tem sido considerado um agente anticancerígeno em potencial. Estudos experimentais realizados com o ácido betulínico têm revelado uma forte seletividade frente às células do melanoma humano, evitando o ataque às células normais. Esta característica faz do ácido betulínico único em comparação aos compostos que são correntemente usados na terapia contra o câncer. (YOGEE SWARI; SRIRAM, 2005).

Além desses estudos, a pesquisa realizada por Riveiro-Cruz et al (2009) demonstrou que o ácido betulínico, isolado da espécie *Byrsonima crassifolia* apresentou um potente efeito

antibacteriano contra diferentes cepas de micro-organismos Gram positivos e Gram negativos, que podem participar na formação do biofilme bucal.

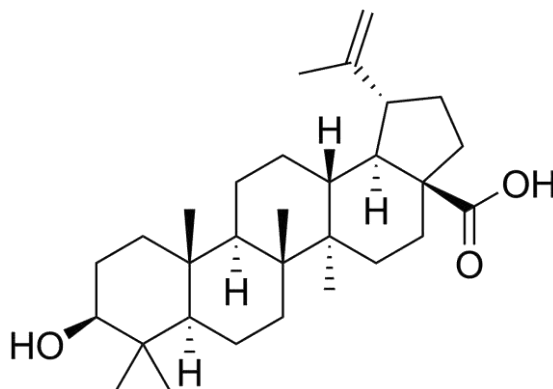


Figura 4 – Estrutura química do ácido Betulínico

2.4.2 Betulina

A betulina (Figura 5), apresenta propriedade anti-inflamatória e antimicrobiana, em especial contra os micro-organismos formadores do biofilme bucal (RECIO et al.,1995; RIVEIRO-CRUZ et al., 2009) e efeitos inibidores ao vírus Epstein-Barr (EBV-EA), agente etiológico do linfoma de Burkitt e carcinoma nasofaríngeo (AKIHISA et al.,2002). Apresenta-se como fármaco potencial para a indústria farmacêutica. Essas moléculas são candidatas ideais para a obtenção de derivados via biotransformação, devido à complexidade e ao grande número de carbonos não ativados, geralmente inacessíveis a reagentes químicos tradicionais (ABRAHAM et al., 1992).

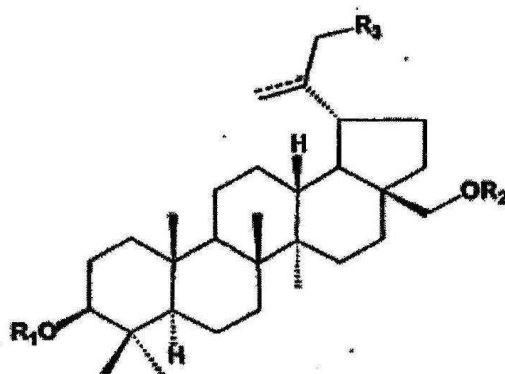


Figura 5 – Estrutura química da betulina

2.4.3 Ácido oleanólico

O ácido oleanólico, pertence à classe de compostos triterpenoides e é amplamente distribuído no reino vegetal e tem sido frequentemente isolado como mistura isomérica (Figura 6) (VASCONCELOS et al., 2006). Dentre as inúmeras atividades biológicas atribuídas ao triterpeno ácido oleanólico, diferentes estudos relatam a atividade analgésica, anti-inflamatória e antioxidante (VASCONCELOS et al., 2003; KANG et. al, 2008; IKEDA; MURAKAMI; OHIGASHI, 2008). Em 1995, Liu descreveu o sucesso do emprego de ácido oleanólico na China para o tratamento de doenças hepáticas, incluindo hepatite aguda e crônica, bem como outras desordens hepáticas.

Também têm sido descritos efeitos sobre patógenos periodontais (WANG et al., 2002; RIVEIRO-CRUZ et al., 2009), atividade biológica contra *Mycobacterium tuberculosis* e também observaram a atividade biológica desse triterpeno contra patógenos orais. Nesse estudo, eles verificaram que ácido ursólico e ácido oleanólico foram os triterpenos que apresentaram maior inibição do crescimento de micro-organismos como: *Enterococcus faecalis*, *Streptococcus salivarius*, *Streptococcus mitis*, *Streptococcus mutans*, *Streptococcus sobrinus* e *Streptococcus sanguinis* (GUA et al., 2004).

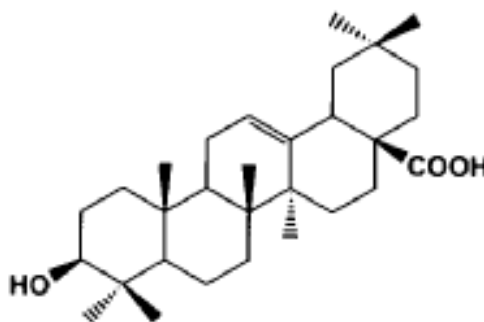


Figura 6 – Estrutura química do ácido oleanólico

2.5 ESTUDOS DA TOXICIDADE DE PLANTAS MEDICINAIS

Uma grande parte da composição química das plantas de uso medicinal ainda é desconhecida pela ciência, e dados recentes afirmam que cerca de 99% das plantas medicinais endêmicas do Brasil ainda não têm seus princípios ativos identificados, o que representa um grande potencial farmacológico e econômico a ser explorado, tornando-se imprescindível à avaliação das potencialidades químicas das plantas brasileiras. Algumas dessas plantas que apresentam propriedades medicinais podem conter substâncias tóxicas, o que torna errado o conceito de que plantas são medicamentos naturais, portanto livres de efeitos tóxicos, sendo

assim, tornando-se necessário o conhecimento científico das características de determinadas plantas, uma vez que as plantas vêm sendo usadas como fitoterápicos sem nenhum conhecimento dos seus efeitos em longo prazo, podendo ocasionar possíveis consequências a quem faz uso das mesmas (SANTOS, 2009).

O estudo toxicológico de uma substância é uma etapa importante para o uso seguro dessa substância na saúde humana, uma vez que tem como objetivo caracterizar os efeitos toxicológicos a partir de sua administração (EATON; KLAASSEN, 1996). Além disso, estudos toxicológicos buscam, entre outras, informações sobre quais doses são capazes de causar efeitos tóxicos (BRITO, 1996). Assim, segundo os princípios básicos da toxicologia, toda substância pode comportar-se como um agente tóxico, dependendo da dose administrada ou absorvida, do tempo de frequência de exposição e das vias de administração (BARROS; DAVINO, 2008). Produtos naturais sejam extratos, frações ou fitoconstituintes, devem ser estudados através de métodos idênticos que avaliem a segurança e a eficácia, de modo semelhante aos compostos sintéticos, visto que seus efeitos além de toxicidade, podem desencadear efeitos mutagênicos, tumoral, irritante e alterações no sistema reprodutor (TALALAY; TALALAY, 2001).

2.6 ESTUDOS *IN SILICO*

Cerca de 50% das razões que levam à insuficiência do desenvolvimento de um fármaco estão associadas com o perfil farmacocinético e toxicológico. Assim, a determinação do perfil farmacocinético juntamente com a toxicidade são parâmetros importantes na definição de biodisponibilidade e efeitos tóxicos de uma molécula, ajudando na redução do tempo e do custo do processo de investigação e desenvolvimento de novas drogas (HANSCH et al, 2004).

Modelos de previsão assistida por computador, as chamadas ferramentas de previsão, desempenham um papel essencial no repertório proposto de métodos alternativos para a avaliação das características farmacológicas e toxicológicas de um composto, além de modelos *in vitro*. Por isso, essas ferramentas são usadas para estudar os compostos existentes e hipotéticos, que são rápidos, reprodutíveis e são normalmente baseados em biorreguladores humanos (ANGELO et al, 2006; SRINIVAS et al, 2014).

Neste contexto, destacam-se os estudos com modelos *in silico*, (expressão usada com o significado de “executado em computador”) que estão sendo aplicados para a avaliação da toxicidade de um composto no meio metabólico de mamíferos, e cuja utilização dentro de um

ambiente regulatório também tem sido incentivada pela legislação recente (MARCHANT, 2012; ANVISA, 2014).

O uso de modelos *in silico* tem evoluído com avanços notáveis nas áreas de correlação, predição, simplificação, automatização, entre outros aspetos relevantes. Claramente, os modelos de Absorção, Distribuição, Metabolismo, Excreção e Toxicidade (ADMET) *in silico*, em comparação com os ensaios experimentais tradicionais, possuem uma aplicabilidade maior para atender a enorme demanda gerada na triagem em larga escala de novas moléculas (BAJORATH, 2004).

Além disso, os ensaios *in vitro* e *in vivo* apresentam desvantagens que limitam o seu uso em larga escala: são complexos e dispendiosos em termos de materiais, infra-estrutura e pessoal qualificado (SAUNDERS, 2004). Por essas razões, há grande interesse da indústria na geração de modelos de ADMET *in silico* que possam rapidamente auxiliar na seleção de moléculas promissoras e guiar a eliminação de compostos com perfil farmacocinético inadequado. Por outro lado, a integração de modelos de ADMET (*in silico*, *in vitro* e *in vivo*) parece ser um caminho essencial a ser seguido em todos os estágios do processo de descoberta de fármacos (GASTEIGER, 2006). Logo, existe uma grande variedade de modelos de ADME *in silico* disponíveis, com diferentes níveis de complexidade e capacidade de processamento.

REFERÊNCIAS

- ABRAHAM, W. R.; KIESLICH, K.; STUMPF, B.; ERNST, L. Microbial oxidation of tricyclic sesquiterpenoids containing a dimethylcyclopropane ring. **Phytochem.**, New York, v.31, n.11, p.3749-3755, 1992.
- ABREU, P. A. **Receptor de NMDA: modelagem molecular por homologia e análise SAR de antagonistas de um potencial alvo terapêutico em doenças neurodegenerativas.** Dissertação (Pós graduação em Neuroimunologia) - Instituto de Biologia, Universidade Federal Fluminense, 2008.
- AESCHBACH, R.; LOLIGER, J.; SCOTT, B. C.; MURCIA, A.; BUTLER, J.; HALLIWELL, B.; ARUOMA, O. I. Antioxidant actions of thymol, carvacrol, 6-gingerol, zingerone and hydroxytyrosol. **Food Chem. Toxicol.**, Oxford, v.32, p.31-36, 1994.
- 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**, São Paulo, v.17, n.1, p.114-140, 2007.
- AKIHISA, T.; TAKAMINE, Y.; YOSHIKUNI, K.; TOKUDA, H.; KIMURA, Y.; UKIYA, M.; NAKASHARA, T.; YOKOCHI, T.; ICHIISHI, E.; NISHINO, H. Microbial transformations of two lupane-type triterpenes and anti-tumor-promoting effects of the transformation products. **J. nat. prod.**, Cincinnati, v.6, n.3, p.278-282, 2002.
- ALVES P. M.; QUEIROZ, L. M. G.; PEREIRA, J. V.; PEREIRA, M. S. V. Atividade antimicrobiana, antiaderente e antifúngica *in vitro* de plantas medicinais brasileiras sobre microrganismos do biofilme dental e cepas do gênero *Candida*. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.**, Brasília, v.42, n.2, p.222-224, 2009.
- ARNOUS, A. H.; SANTOS, A. S.; BEINER, R. P. C. Plantas medicinais de uso caseiro – conhecimento popular e interesse por cultivo comunitário. **Rev Esp. Saúde**, Londrina, v.6, n.2, p.1-6, 2005.
- AXELSSON, P.; LINDHE, J. The effect of a preventive programme on dental plaque, gingivitis and caries in schoolchildren. Results after one and two years. **J. Clin. Periodontol.**, Copenhagen, v.1, n. 2, p. 126- 138, 1974.
- BAJORATH, J. Positioning ADMET *in silico* Tools in Drug Discovery. **Drug Discov. Today Dis. mech.**, Oxford, v.9, p.14-15, 2004.
- BARNES, D. G.; DOURSON, M. Reference dose (RfD): Description and use in health risk assessments. **Ann. rev. pharmacol. toxicol.**, v.8, p.471-486, 1988.
- BUFFON, M. C. M.; PECHARKI, G. D.; MARIOT, C. A.; GOMES, E. C. O uso de fitoterápicos em odontologia. **Rev. Pro-odonto**, ciclo 4, módulo 4, 2011.
- CHAPPELL, J. Biochemistry and molecular biology of the isoprenoid biosynthetic pathway in plants. **Annu. rev. plant physiol. plant mol. biol.**, Palo Alto, v.46, p.521-547, 1995.

CLARK, D. O. Pharmacokinetic studies in developmental toxicology: practical considerations and approaches. **Toxicol. Mech. Method.**, Philadelphia, v.3, p.223-251, 1993.

CURY, J. A. Controle Químico da Placa Dental. In: KRIGER, L. (Coord.). **Promoção de saúde bucal: Paradigma, Ciência, Humanização.** São Paulo: 3ed. Artes Médicas/ABOPREV, 2003, p. 141-151.

EDRIS, A. E. **Pharmaceutical and Therapeutic Potentials of Essential Oils and Their.**

FARIAS, J. A. C.; FERRERO, J. N. S.; SILVA, J. P. AGRA, I. K. R.; OLIVEIRA, F. M.; CANDEA, A. L. P.; CONTE, F. P.; FERRARIS, F. K.; HENRIQUES, M. G. M. O.; CONSERVA, L. M.; BARRETO, E. Modulation of inflammatory processes by leaves extract from *clusia nemorosa* both in vitro and in vivo animal models inflammation, 2001.

FEJERSKOV, O.; KIDD, E. **Cárie dentária. A doença e seu tratamento clínico.** São Paulo: Santos, 2005.

FENECH, M.; HOLLAND, N.; CHANG, P. W.; ZEIGER, E.; BONASSI, S. The human micronucleus project – Aninternational collaborative study on the use of the micronucleus technique for measuring DNA damage in humans. **Mutat. res., DNA repair.**, Amsterdam, v.428, p.271-283, 1999.

FRIGHETTO, N.; WELENDORF, R. M., SILVA, A. M. P.; NAKAMURA, M. J.; SIANI, A. C. Aplicação de cromatografia centrífuga de contra-corrente na purificação de ácido ursólico das folhas de *Eugenia brasiliensis* Lam. **Rev. bras. Farmacogn.**, São Paulo, p.338-343, 2005.

GAETTI-JARDIM, J. R. E.; AVILA-CAMPOS, M. J.; CIESIELSKI, F.; SOUSA, F. R. N. Occurrence of yeasts, pseudomonads and enteric bacteria in the oral cavity of patients undergoing head and neck radiotherapy. **Braz. j. microbiol.**, São Paulo, v.42, p.1047-1055, 2011.

GARCIA, R.; ALVES, E. S. S.; SANTOS, M. P.; AQUIJE G. M. F. V.; FERNANDES, A. A. R.; SANTOS, R. B.; VENTURA, J. A.; FERNANDES, P. M. B. Antimicrobial activity and potential use of monoterpenes as tropical fruits preservatives. **Braz. j. microbiol.**, v.39, p.163-168, 2008.

GASTEIGER, J. The Central Role of Chemoinformatics, Chemom. Intell. **Lab. Syst.**, v.82, p.200-209, 2006.

GEBRAN, M. P; GEBERT, A. P. O. Controle químico e mecânico de placa bacteriana. **T. Cien. Cult.**, Curitiba, n.26, p.45-58, 2002.

GIBBONS, R. J. Adherent interactions which may affect microbial ecology in the mouth. **Dent. res. j.**, Washington, v.63, p.378-385, 1984.

GLÓRIA, B. A. **Programa de Plantas Medicinais e Fitoterapia: Estruturas Secretoras nos Vegetais Superiores**. Edição Cursos Agrozootécnicos ESALQ-USP. Piracicaba. São Paulo, 1994, 81p.

GODOY, A. S. Introdução à pesquisa qualitativa e suas possibilidades. **Rev. adm. emp.**, São Paulo, v.35, n.2, mar./abr., 1995.

GUA, J. Q.; WANG, Y.; FRANZBALU, S. G.; MONTENEGRO, G.; TIMMERMANN, B. N. Constituintes of *Quinchamalium majus* with potencial antitubercular activity. *Zeitschrift für Naturforschung C*, **J. Biosci.**, Germany, v.59, p.797-802, 2004.

GUYOT, M. M. Perspectivas de la fitoterapia. **Acta Farm. Bonaer.**, Buenos Aires, v. 9, n.2, p.131 –138, 1990.

HAY DI. Some observations on human saliva proteins and their role in the formation of the acquired enamel pellicle. **Dent. res. j.**, v. 48 (Sup 5), p.806- 10, 1969

HINRICHSEN, S. L.; FALCAO, E.; VILELLA, S.; COLOMBO, A. L.; NUCCI, M.; MOURA, L.; RÊGO, L.; LIRA, C.; ALMEIDA, L. Candidemia in a tertiary hospital in northeastern Brazil. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.**, Brasilia, v.41, p.394–398, 2008.

JULIÃO, L. S.; TAVARES, E. S.; LAGE, C. L. S.; LEITÃO, S. G. Cromatografia em camada fina de extratos de três quimiotipos de *Lippia alba* (Mill) N.E.Br. (erva-cidreira). **Rev. bras. Farmacogn**, São Paulo, v.13(Supl.), p.36-38, 2003.

JURISTO, N.; MORENO, A. M. Basics of Software Engineering Experimentation, Hardcover, 2001.

KIMMEL, G. L.; CLEGG, E. D.; CRISP, T. M. Reproductive toxicity testing: A risk assessment perspective. In: WITORSCH, R. J. (Ed.). **Reprod. Toxicol.**, New York: Raven Press. p. 75-98, 1995.

KIRSCH-VOLDERS, M.; SOFUNI, T.; AARDEMA, M.; ALBERTINI, S.; EASTMOND, D.; FENECH, M.; ISHIDATE JR., M.; KIRCHNER, S.; LORGE, E.; MORITA, T.; NORPPA, H.; SURRALLÉS, J.; VANHAUWAERT, A.; WAKATA, A. Report from the in vitro micronucleus assay working group. **Mutat. Res., DNA repair**. Amsterdam, v.540, p.153-163, 2003.

KRIGER, L. **Promoção de saúde bucal**. 1. ed. São Paulo: Editora Artes Médicas Ltda., 1997, p.115-140.

LIMA, G. R. Proposta de resolução específica para manipulação de plantas medicinais e fitoterápicos. Monografia (Ciências Farmacêuticas) - Brasília, Universidade de Brasília, 2006.

LINDHE, J. **Tratado de Periodontologia Clínica e Implantodontia Oral**. 38ed.Rio de Janeiro, Editora Guanabara Koogan, 720p.

LOPES, J.; SIQUEIRA, J. E. **Tratamento das infecções endodônticas**. 2ed. Rio de Janeiro: Editora médica e científica, 1999, 513p.

- MAJER, B. J.; LAKY, B.; KNASMÜLLER, S.; KASSIE, F. Use of the micronucleus assay with exfoliated epithelial cells as a biomarker for monitoring individuals at elevated risk of genetic damage and in chemoprevention trials. **Mutat. Res., DNA repair.**, Amsterdam, v.489, p.147-172, 2001.
- MARCHANT, C. A. Computational toxicology: a tool for all industries. **Wire. comput. mol. sciences**, v. 2, p.424-434, 2012.
- MARINHO, B. V. S.; ARAÚJO, A. C. S. O uso de enxaguatórios bucais sobre a gengivite e o biofilme dental. **Indent j. int. dent.**, Cairo, v.6, n.4, p. 124-131, 2007.
- MARSH, P. D.; BRADSHAW, D. J. Physiological approaches to the control of oral biofilms. **Adv. dent. res.**, Washington, v.11, p.176-185, 1997.
- MATTOS, D. H. Y. Utilização da clorexidina no controle dos estreptococos do grupo mutans e dos lactobacilos em pacientes portadores de aparelhos ortodônticos fixo.
- MENDES, M. M. S. G. et al. Agentes químicos para controle de placa bacteriana. **Rev. dental press periodontia implantol.**, Maringá, v.5, n.2, p.253-256, jul./dez., 1995.
- MILLER, R. C. The Micronucleus Test as an *in Vivo* Cytogenetic Method. Environmental Health Perspective. **Institute. Med. Resear. Camden**, New Jersey, 1973.
- MONFRIN, R. C. P.; RIBEIRO, M. C. Avaliação in vitro de anti-sépticos bucais sobre a microbiota da saliva. **R. Assoc. Paul. Cir. Dent.**, São Paulo, v.54, n.1, p.401-407, 2000.
- MORAN, J.; ADDY, M., ROBERTS, S. A Comparison of natural product, triclosan and chlorhexidine mouthrinses on 4-day plaque regrowth. **J. Clin. Periodontal**, Copenhagen, v. 19, n. 8, p. 578-582, Sept. 1992
- NASCIMENTO, D. F. F.; SILVA, A. M.; MARCHINI, L. O papel das bactérias orais em doenças sistêmicas. **Rev. ABO. nac**, São Paulo, v.14, n.2, p.117-122, 2006.
- NEWBRUN, E. Agentes antiplaca/antigengivite. In: YAGIELA, J. A.; NEIDLE, E; DOWN, F. J. **Farm. ter. dent**, 4ª ed. Rio de Janeiro. Editora Guanabara Koogan, cap .43, 1998, p.564-572.
- OLIVEIRA, M. F. S. Fitoterapia e Biodiversidade no Brasil: saúde, cultura e sustentabilidade. **Ver. Ideas. Ambient**, 2005.
- OLIVEIRA, R. A. G.; LIMA, E. O.; VIEIRA, W. L. Estudo da interferência de óleos essenciais sobre a atividade de alguns antibióticos usados na clínica. **Rev. bras. Farmacogn**, São Paulo, v.16, n.1, p.77-82, 2006.
- REBOREDO, M. M.; LUCINDA, L. M. F.; ROCHA, C. B.; QUEIROZ, G. T.; FARIA, V. C.; VIEIRA, V. A. Avaliação da toxicidade do extrato aquoso de *Caesalpinia férrea* em órgãos vitais, no sistema reprodutor e na produção de espermatozoides de ratos Wistar submetidos a tratamento subagudo. **Bol. Cent. Biol. Reprod.**, Juiz de Fora, v.26, p.11-17, 2007.

ROMEIRO, R. L.; MAJEWSKI, M.; MOLINA, F.; JUNQUEIRA, J. C.; OLIVEIRA, L.; JORGE, A. O. C. Aderência de *C. albicans*, *C. dubliniensis* e *C. glabrata* à superfície de implantes lisos e rugosos. **Implant News**, v.6, n.1, p.33-37, 2009.

SANCHEZ, B.; GABRIEL, J.; MARTINEZ, M.; JAIRO, R.; STASHENKO, E. Actividad antimicrobacteriana de terpenos/ Antimycobacterial activity of terpenes. **Rev. Univ. Ind. Santander, Salud.**, Bucaramanga, v.41, n.3, p.231-243, 2009.

SANTOS, F. S. **As plantas Brasileiras, os jesuítas e os indígenas do Brasil: história e ciência na triaga brasílica (séc. XVII-XVIII)**. São Paulo: Casa do Novo Autor, 2009.

SAUNDERS, K. C. Automation and Robotics in ADME Screening. **Drug Discov. Today: Techno.**, Oxford, v.1, p.373-380, 2004.

SHARKEY, T. D.; YEH, S. Isoprene emission from plants. **Annu. rev. plant physiol. plant mol. biol.**, Palo Alto, v.52, p.407-436, 2001.

SILVA, F. C.; BARROS, M. A. B.; VIANA, R. R.; ROMÃO, N. F.; OLIVEIRA, M. S.; MENEGUETTI, D. U. O. Avaliação de mutagênese provocada por sulfato de ferro através do teste micronúcleo em células da medula óssea de camundongos. **Rev. Facul. Edu. M Ambien.**, v. 2, n. 1, p.13-22, 2011.

SILVA, M. A. S.; SILVA, M. A. R.; HIGINO, J. S.; PEREIRA, M. S. V.; CARVALHO, A. A. T. C. Atividade antimicrobiana e antiaderente in vitro do extrato de *Rosmarinus officinalis* Linn. sobre bactérias orais planctônicas. **Rev. bras. Farmacogn.**, São Paulo, v.18, n.2, p.236-240, 2008.

SOCRANSKY, S.; HAFFAJEE, A. D. Dental biofilms: difficult therapeutic targets. **Periodontol 2000**, Copenhagen, v.28, p.12-15, 2002.

SOYAMA, P. Plantas medicinais são pouco exploradas pelos dentistas. **Cienc. Cult**, São Paulo, v.59, n.1, p.12-13, 2007.

SVENSATER, G.; BERGENHOLTZ, G. Biofilms in endodontic infections. **Endodontic topics**, v.9, p.27-36, 2004.

THYLSTRUP, A.; FEJERSCOV, O. **Cariologia Clínica**. 2ª edition. São Paulo: Santos, 1995.

THYLSTRUP, A.; FEJERSKOV, O. **Cariologia Clínica**. 4ª ed. São Paulo, Editora Santos, 1994, p.331-327.

TOLBERT, P. E.; SHY, C. M.; ALLEN, J. W. Micronuclei and other nuclear anomalies in buccal smears: A field test in snuff users. **Am. J. Epidemiol.**, Baltimore, v.134, p.840-850, 1991.

TRABULSI, L. R.; ALTERTHUM, F.; GOMPertz, O. F.; CANDEIAS, J. A. N. **Microbiologia**. 3ª edition. Rio de Janeiro, São Paulo, Belo Horizonte: 1999.

TUROLLA, M. S. R.; NASCIMENTO, E. S. Informações toxicológicas de alguns fitoterápicos utilizados no Brasil. **Rev. bras. Ciênc. Farmac**, São Paulo, v.42, n.2, p.289-306, 2006.

VASCONCELOS, M. A. L.; ROYO, V. A.; FERREIRA, D. S.; CROTTI, A. E. M.; SILVA, M. L. A.; CARVALHO, J. C. T.; BASTOS, J. K.; CUNHA, W. R. Evaluation of the In vivo analgesic and anti-inflammatory activities of ursolic acid and oleanolic acid from *Miconia albicans* (Melastomataceae). **Zeitschrift für Naturforschung, Germany**, Tübingen, v.61, p.477-482, 2006.

VINHOLIS, A H. et al. Mecanismo de ação da clorexidina. **Revista Periodontia.**, Maringá, p.281-282, jan./jun., 1996.

WAGNER, K. H.; ELMADFA, I. Biological relevance of terpenoids. **Ann Nutr Metab.**, Basel, v.47, p.95-106, 2003.

WANG, Q.; FAN, M.; BIAN, Z.; NIE, M.; CHEN, Z. Extract and identify ingredient from *Ligustrum lucidum* Ait and study its effect to periodontal pathogen. **Zhong. Kou. Qiang. Yi Xue. Za Zhi.**, China, v. 37, p. 388-90, 2002.

WILDERER, P. A.; CHARACKLIS, W. G. Structure and function of biofilms. In: CHARACKLIS, W. G.; WILDERER, P. A. **Structure and function of biofilms**. Chichester, UK: John Wiley, 1989, p. 5-17.

WILLIAMS, H. K. Molecular pathogenesis of oral squamous carcinoma. **Clin Pathol: Mol. Pathol.**, London, v.53, p.165-172, 2000.

WOHLIN, C.; RUNESON, P.; HÖST, M.; OHLSSON, M. C.; REGNELL, B.; WESSLÉN, A. Experimentation in Software Engineering: an Introduction, Massachusetts, USA. **Ann. Oncol.**, v.5, n.7, p.7923-8682, 2001.

YOGESWARI, P.; SRIRAM, D. Betulinic acid and its derivatives: a review on their biological properties. **Curr. Med. Chem.**, Schipol, v.12, n.6, p.657-666, 2005.

3 ARTIGO

ESTUDO DOS EFEITOS TÓXICOS DOS TERPENOS ÁCIDO BETULÍNICO, BETULINA E ÁCIDO OLEANÓLICO: UMA ABORDAGEM *IN SILICO*

TOXICITY STUDY OF TERPENES BETULINIC ACID, BOTULIN AND OLEONOLIC ACID: AN *IN SILICO* APPROACH

Clarissa de Moraes Martins Neri¹

Eduardo Bitu Pinto²

Abrahão Alves de Oliveira Filho³

RESUMO: Há tempos as plantas são usadas pela população com o objetivo de tratar e curar doenças. Na odontologia tem-se estimulado a avaliação de diferentes extratos de plantas para o controle do biofilme bucal. Os terpenos são metabólitos secundários que mediam interações importantes entre plantas e o meio ambiente. Vários terpenos são largamente utilizados na agricultura, alimentos e indústrias, e como um antisséptico geral na prática médica. Estudos têm mostrado que terpenos têm diversas propriedades farmacológicas incluindo antifúngico, antibacteriano, anti-inflamatória antioxidante e antiespasmódico. Logo, o presente estudo tem como objetivo avaliar o potencial tóxico de alguns desses terpenos, Ácido Betulínico, Betulina e Ácido oleanólico, utilizando modelos *in silico*. Ao se realizar a classificação metodológica desta pesquisa, pode-se perceber que trata-se de um estudo aplicado, quantitativo e experimental. Todas as informações químicas dos terpenos selecionados foram obtidas no site <http://www.chemspider.com/>. Para a análise da toxicidade teórica foi submetido ao estudo *in silico* dos parâmetros ADMET usando o programa Osíris Property Explorer. Para a análise dos dados obtidos na pesquisa utilizou-se o software Microsoft excel[®] 2010. Nos resultados encontrados no presente estudo, os três terpenos analisados, assim como a Clorexidina, não apresentaram nenhum potencial mutagênico, tumorigênico, irritante, como também não apresentaram danos ao sistema reprodutor sendo classificados na escala 1, significativa de dano ausente. Demonstrando assim, *in silico*, a segurança do uso destes compostos, no entanto, os testes clínicos são fundamentais para a comprovação destes resultados. Pode-se concluir que, assim como a Clorexidina, estes terpenos estão sendo descobertas para desenvolvimento de terapias alternativas na odontologia, e testes *in silico* são de extrema importância para verificar a qualidade destes novos compostos.

Palavras-chave: Biofilme bucal, Odontologia, Terpenos.

ABSTRACT: For a long time plants are used by population in order to treat and cure diseases. In dentistry it has encouraged the evaluation of different plant extracts for the oral biofilm control. Terpenes are secondary metabolites that mediate important interactions between plants and the environment. Many terpenes are widely used in agriculture, food and industries and as a general antiseptic in medical practice. Studies have shown that terpenes have several pharmacological properties including antifungal, antibacterial, anti-inflammatory, antioxidant and anti-spasmodic. Therefore, the present study aims to evaluate the potential toxicity of some of these terpenes, Betulinic Acid, Betulin and oleanolic acid, using *in silico* models. When performing the methodological classification of this research, we realized that it is an applied, quantitative and experimental study. All chemical information from the selected terpenes were obtained in the site <http://www.chemspider.com/>. For the analysis of theoretical toxicity it was submitted to the *in silico* study of ADMET parameters using the Osiris Property Explorer program. For the analysis of obtained data in the research it was used the software Microsoft Excel® 2010. On the results found in this study, the three analyzed terpenes, as well as chlorhexidine, showed no mutagenic, tumorigenic and irritating potentials, and also did not present damage to the reproductive system being classified on the scale 1, absent significant damage. Demonstrating, *in silico*, the safety of these compounds, however, clinical trials are crucial to prove these results. It can be concluded that, as well as Chlorhexidine, these terpenes are being discovered to develop alternative therapies in dentistry, and *in silico* tests are extremely important to check the quality of these new compounds.

Keywords: Oral Biofilm, Dentistry, Terpenes.

1 INTRODUÇÃO

O conhecimento sobre a placa dental evoluiu significativamente desde a sua primeira observação, por van Leewenhoek, em 1684. Modernamente, a placa dental é reconhecida como um biofilme verdadeiro (WILDERER; CHARACKLIS, 1989), o qual pode ser definido como uma população microbiana aderida a um substrato orgânico ou inorgânico, estando envolvida por seus produtos extracelulares, os quais formam uma matriz intermicrobiana, podendo ocorrer na superfície de várias estruturas na natureza (SVENSÄTER, BERGENHOLTZ, 2004). Na boca, o biofilme é composto por micro-organismos sobre uma camada de proteína denominada película adquirida do esmalte, que é constituída por glicoproteínas salivares, fosfoproteínas, lipídeos e componentes do fluído gengival. (FEJERSKOV; KIDD, 2005).

Os micro-organismos presentes no biofilme podem se dividir em aeróbios, anaeróbios facultativos e anaeróbios estritos. Podem também ser divididos de acordo com a coloração apresentada, em Gram-positivos e Gram-negativos. (TRABULSI et al., 1999). O biofilme é academicamente classificado em supragengival e subgengival. A composição microbiana destes dois tipos difere no tipo e/ou proporção de espécies bacterianas, pois estas áreas estão sujeitas a diferentes condições ambientais, como por exemplo, disposição de nutrientes e exposição ao oxigênio. As espécies bacterianas mais comumente detectadas no biofilme são: *S. sanguis*, *S. oralis*, *S. mitis biovar 1 e 2*, *S. gordonii*, *S. mutans*, *S. salivarius*, *Actynomices naseslundii*, *Actynomices Odontolyticus*, *Neisseria sp.*, *Lactobacillus sp.*, *Veillonella sp.*, *Prevotella sp.*, *Haemophilus*, *Fusobacterium sp.*, *Eubacterium* e Bacterióides (NOGUEIRA et al., 2007; ALVES et al., 2010).

Muitos estudos demonstraram que o biofilme dental é o fator determinante da cárie dentária e doença periodontal, justificando a utilização de medidas para o seu controle (AXELSSON; LINDHE, 1974; KORNMAN, 1986), dentre elas, o controle mecânico do biofilme (escovação e uso do fio dental) é o mais aceito, e os agentes químicos têm sido utilizados como coadjuvantes da higiene bucal quando incorporados em soluções para bochecho (CURY, 2003). Há constante necessidade de se avaliar meios alternativos para o controle do biofilme. A fitoterapia pode ser mais um recurso dentro dos programas de prevenção e promoção em saúde bucal. Há tempos as plantas são usadas pela população com o objetivo de tratar e curar doenças (BUFFON, 2001). Com o importante crescimento mundial da fitoterapia dentro de programas preventivos

e curativos tem-se estimulado a avaliação da atividade de diferentes extratos de plantas para o controle do biofilme dental (LIMA et al, 2011).

A maioria destas terapias envolvem o uso de extratos de plantas ou seus compostos ativos, tais como os terpenos (WAGNER; ELMADFA, 2003). Segundo GLÓRIA (1994), os terpenos representam o grupo mais importante de substâncias químicas secretadas, sendo derivados do isopropeno (unidade ramificada de cinco carbonos) e classificados de acordo com o número mínimo dessas unidades presentes na molécula. Os terpenos são metabólitos secundários, porque eles são classificados como não essencial para a sua viabilidade; no entanto, eles mediam interações importantes entre plantas e o meio ambiente (CHAPPELL, 1995). Vários terpenos são largamente utilizados na agricultura, alimentos e indústrias, e como um antisséptico geral na prática médica (AESCHBACH et al, 1994). Estudos têm mostrado que terpenos têm diversas propriedades farmacológicas incluindo antifúngico, antibacteriano, anti-inflamatória antioxidante e antiespasmódico (GARCIA et al, 2008; OTELHO et al., 2007; SANCHEZ et al., 2009; JULIÃO et al., 2003).

A utilização de terpenos pode exercer efeitos adversos no organismo, caracterizando assim um grave problema de saúde pública (REBOREDO et al., 2007). Estes efeitos, bem como a eventual ação sinérgica com outras drogas, são bastante comuns. Neste contexto, testes toxicológicos avaliam os efeitos do tratamento em muitos órgãos (CLARK, 1993). Estes parâmetros são usados para caracterizar doses, relações de resposta, e ajudar a selecionar as concentrações ideais utilizadas em tratamentos com essas substâncias (BARNES E DOURSON, 1998).

Sabendo-se da importância da descoberta de produtos naturais com efeitos terapêuticos, bem como, a possibilidade de efeitos tóxicos ao organismo causados pelos terpenos, torna-se relevante estudar o potencial toxicológico de alguns exemplos destes metabólitos secundários com propriedade antimicrobiana já relatada contra bactérias que compõe o biofilme bucal, como por exemplo Ácido Betulínico, a Betulina, e o Ácido Oleanólico, avaliando o efeito mutagênico, tumoral, irritante e alterações no sistema reprodutor causados pelos mesmos e comparar os resultados com a Clorexidina, um agente antimicrobiano padrão utilizado na Odontologia, afim de se confirmar a possibilidade de novas opções terapêuticas.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

- ✓ Avaliar o potencial tóxico dos terpenos Ácido Betulínico, Betulina e Ácido oleanólico, utilizando modelos *in silico*.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- ✓ Verificar o potencial mutagênico dos terpenos;
- ✓ Avaliar o potencial carcinogênico dos terpenos;
- ✓ Investigar a irritabilidade e a ação sobre o sistema reprodutor dos terpenos;
- ✓ Comparar os resultados obtidos com o padrão farmacológico utilizado na odontologia, o Digluconato de Clorexidina a 0,12%.

3 METODOLOGIA

3.1 CLASSIFICAÇÃO DA PESQUISA

Ao se realizar a classificação metodológica desta pesquisa, pode-se perceber que se trata de um estudo aplicado, quantitativo e experimental.

De acordo com Barros; Lehfeld (2000), o estudo aplicado tem como motivação a necessidade de produzir conhecimento para aplicação de seus resultados, com o objetivo de contribuir para fins práticos, visando à solução mais ou menos imediata do problema encontrado na realidade. Na maioria dos casos, as pesquisas aplicadas exigem e partem de estudos teóricos, portanto, a teoria não deve ser considerada como aspecto restrito às pesquisas bibliográficas. Na sua estruturação mais comum, um estudo aplicado apresenta: fundamentação teórica; metodologia de pesquisa; Análise e discussão dos dados (NUNAN, 1997). A prática de estudos de natureza aplicada, nos mais diversos campos do saber, pode ser motivada com objetivos variados que incluem: Buscar respostas e resoluções para os problemas, formular teorias, testar teorias, produzir conhecimentos, caracterizar um contexto ou uma população, mensurar fenômenos, identificar probabilidades, observar e descrever comportamentos e explorar um aspecto pouco conhecido (GIL; RICHARDSON, 2002).

A pesquisa experimental, em termos gerais, tem a finalidade de descobrir algo desconhecido ou de testar uma hipótese. As investigações podem ser com o caráter de avaliar, caracterizar, prever e melhorar novas tecnologias antes de serem inseridas na indústria. Ele envolve um investigador que coleta os dados e realiza uma análise para determinar o que os dados significam. Os principais elementos de um estudo experimental são: as variáveis, os participantes, objetos, hipóteses e a estratégia conduzida. Observou-se nos últimos anos, na Engenharia de Software, um crescente interesse em executar estudos experimentais para avaliar o uso de novas tecnologias (KITCHENHAM et al, 1996; WOHLIN et al., 2000; JURISTO; MORENO 2002 BASILI, 2006).

Na pesquisa quantitativa, o pesquisado preocupa-se em obter uma medição objetiva e quantificação dos resultados, buscando a precisão, evitando distorções na etapa de análise e interpretação dos dados, garantindo assim, uma margem de segurança em relação às inferências obtidas (GODOY, 1995).

3.2 OBTENÇÃO DAS INFORMAÇÕES QUÍMICAS DOS MONOTERPENOS

Para a realização dos estudos *in silico*, todas as informações químicas (estrutura química da molécula, massa molecular, polaridade, CAS-number) dos terpenos selecionados (Ácido Betulínico, Betulina Ácido Oleanólico) foram obtidas no site <http://www.chemspider.com/>.

3.3 ANÁLISE TEÓRICA DA TOXICIDADE

Para a análise da toxicidade teórica, a estrutura do terpeno foi submetida ao estudo *in silico* dos parâmetros ADMET (absorção, distribuição, metabolismo, excreção e toxicidade) usando o programa Osiris Property Explorer (<http://www.organic-chemistry.org/prog/peo/drugScore.html>). Nesta análise foram determinados os potenciais mutagênico, tumorigênico, irritante e sobre a reprodução (ABREU, 2008).

3.4 ANÁLISE DOS DADOS

Para a análise dos dados obtidos na pesquisa e futura construção dos gráficos utilizou-se o software Microsoft excel[®] 2010. Os resultados foram classificados a partir de uma escala de 1 a 3, onde 1 significava toxicidade ausente, 2 toxicidade moderada e 3 toxicidade severa.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

O crescimento mundial da fitoterapia entre os programas preventivos e curativos tem estimulado a avaliação dos extratos de plantas para o uso na odontologia como controle do biofilme dental e outras afecções bucais (OLIVEIRA et al., 2007).

As pesquisas com produtos naturais no meio odontológico buscam por novos produtos com maior atividade terapêutica, com menor toxicidade e melhor biocompatibilidade, além de apresentarem custos mais acessíveis à população. A aceitação popular da fitoterapia leva a boas perspectivas no mercado de produtos odontológicos que contém substâncias naturais, e estes podem ser introduzidos desde que estudos laboratoriais e clínicos específicos comprovem sua eficácia (AGRA, 2007).

Produtos naturais sejam extratos, frações ou fitoconstituintes, devem ser estudados através de métodos idênticos que avaliem a segurança e a eficácia, de modo semelhante aos compostos sintéticos, visto que seus efeitos além de toxicidade, podem desencadear efeitos mutagênicos, tumoral, irritante e alterações no sistema reprodutor (TALALAY; TALALAY, 2001).

A determinação do perfil farmacocinético juntamente com a toxicidade são parâmetros importantes na definição de biodisponibilidade e efeitos tóxicos de uma molécula, ajudando na redução do tempo e do custo do processo de investigação e desenvolvimento de novas drogas (HANSCH et al, 2004).

Modelos de previsão assistida por computador, as chamadas ferramentas de previsão, desempenham um papel essencial no repertório proposto de métodos alternativos para a avaliação das características farmacológicas e toxicológicas de um composto, além de modelos *in vitro* (ANGELO et al, 2006; SRINIVAS et al, 2014).

Neste contexto, destacam-se os estudos com modelos *in silico* (expressão usada com o significado de “executado em computador”), que estão sendo aplicados para a avaliação da toxicidade de um composto no meio metabólico de mamíferos, e cuja utilização dentro de um ambiente regulatório também tem sido incentivada pela

legislação recente e que podem fornecer várias previsões sobre dados como os possíveis potenciais mutagênicos, tumorigênicos, irritantes e tóxicos sobre diferentes sistemas do organismo humano (MARCHANT, 2012; ANVISA, 2014).

Os efeitos mutagênicos podem ser observados por meio da formação de micronúcleos, que são pequenos corpos contendo ácidos desoxirribonucleicos (DNA), localizados no citoplasma, resultantes de quebras cromossômicas, formando fragmentos acêntricos, ou com sequências de cromossomos inteiros que não se prendem ao fuso mitótico e dessa forma, não chegam aos polos das células durante a mitose ou a meiose (MILLER, 1973). Os tecidos epiteliais de revestimento são mais afetados diretamente por agentes químico-físicos, que podem expressar uma condição de genotoxicidade, especificamente o epitélio oral (tecido pavimentoso estratificado não queratinizado) apresenta maior capacidade de absorção, devido às estruturas de suas células (FENECH et al., 1999).

Nos resultados encontrados no presente estudo, os três terpenos analisados, assim como a Clorexidina, não apresentaram nenhum potencial mutagênico, sendo classificados na escala 1, significativa de mutagenicidade ausente (Gráfico 1). Demonstrando assim, *in silico*, a segurança do uso destes compostos em relação a futuros danos sobre células do corpo humano.

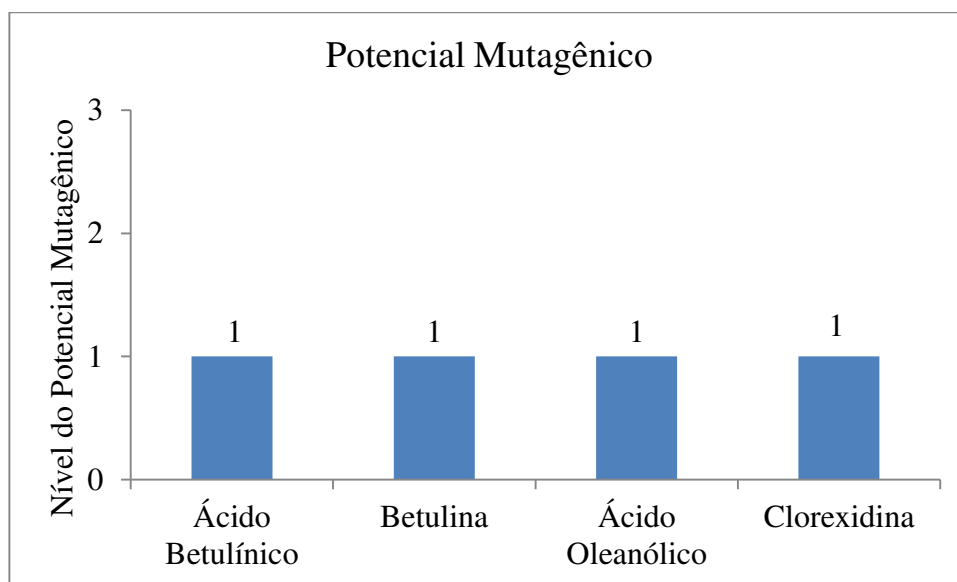


Gráfico 1- Potencial Mutagênico dos terpenos em comparação com a clorexidina

Estes resultados estão de acordo com o estudo de Alakurtti et al. (2006) que verificou que a betulina e os outros derivados dela não são tóxicos e nem mutagênicos; mostra também que o ácido betulínico pode ser sintetizado da betulina, ou seja, assim como ela, não apresenta potencial mutagênico.

A formação tumoral envolve mecanismos biológicos complexos e ainda desconhecidos, por isso, a identificação de marcadores para determinar quais células realmente apresentam potencial tumorigênico é um processo complexo (VALEJO, 2010). Segundo Williams (2000), muitos eventos podem induzir processos de carcinogênese, causando modificações genéticas nas células, alterando o controle da diferenciação, mitose e apoptose celular.

Com base nos resultados encontrados no gráfico 2, os três compostos não apresentaram potencial tumorigênico, assim como a Clorexidina, demonstrando mais uma vez a segurança do uso dessas substâncias sem risco de desenvolvimento de danos.

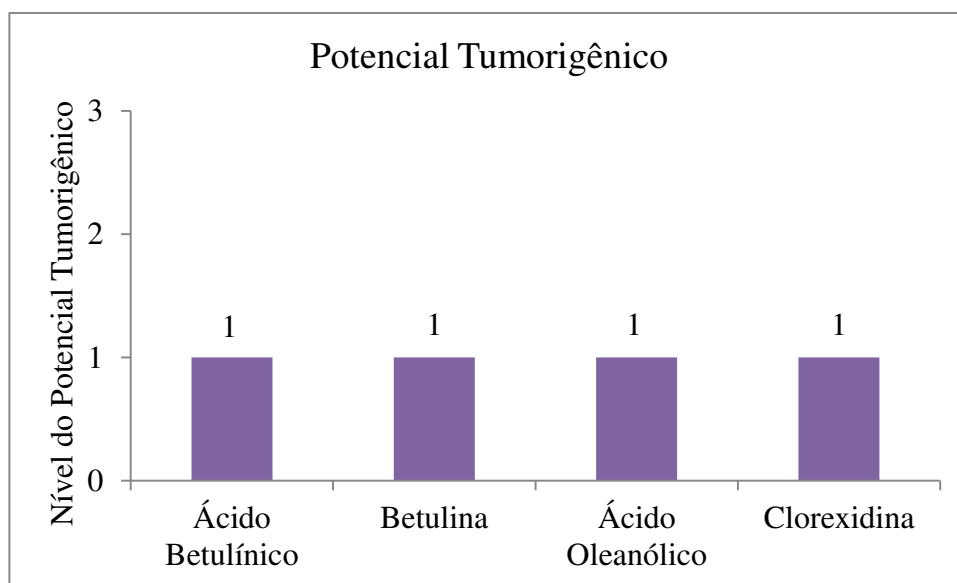


Gráfico 2- Potencial Tumorigênico dos terpenos em comparação com a clorexidina

Estes resultados corroboram o estudo de Liu (2005) que comprovou o uso clínico do ácido betulínico em várias doenças, incluindo quimioterapias anticâncer. No estudo de Jing. (2008) foi comprovado que o ácido betulínico pode inibir a formação de células tumorais, a transferência, a diferenciação induzida e a apoptose de células tumorais.

Testes toxicológicos de plantas medicinais avaliam os efeitos do tratamento em muitos órgãos (BARNES; DOURSON, 1998), bem como a influência do tratamento sobre a reprodução (CLARK, 1993). Estes parâmetros são usados para caracterizar dose relações de resposta, e ajudar a selecionar as doses utilizadas em estudos da exposição crônica a certas substâncias (BARNES; DOURSON, 1998).

O sistema reprodutor masculino, por exemplo, é muito sensível à ação fatores de prejudiciais, e a exposição a certos agentes podem causar alterações nesses órgãos, prejudicando a reprodução e a competência sexual do indivíduo (REBOREDO et al., 2007). A ação de um agente tóxico pode interferir com a maturação sexual, a produção e transporte de gametas, o ciclo espermatogênico, o comportamento sexual e / ou a fertilidade (KIMMEL et al., 1995).

Quanto à avaliação para o nível de dano causado ao sistema reprodutor, pôde-se observar que os três terpenos, assim como a Clorexidina, foram classificados na escala 1, significativa de ausência de danos, conforme mostra o Gráfico 3.

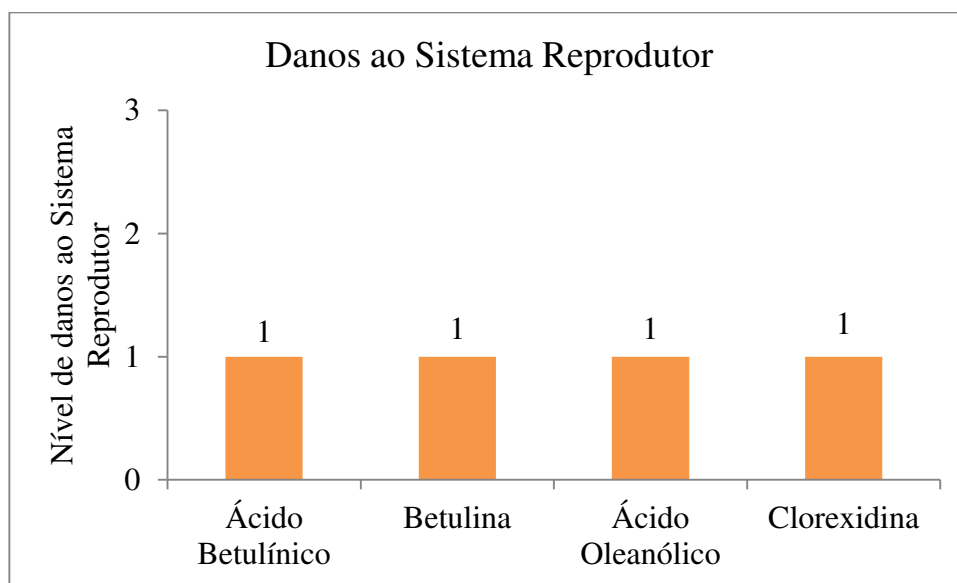


Gráfico 3- Nível de danos ao Sistema Reprodutor dos terpenos em comparação com a Clorexidina

Os resultados encontrados vão de acordo com estudos como os de Sousa. (2009) verificando-se que os triterpenos encontrados na *Cimicífuga Racemosa*, além de não causarem danos ao sistema reprodutor, é uma planta utilizada em mulheres para o tratamento de sintomas da menopausa.

A irritação pode ser definida como intolerância local podendo corresponder a reações de desconforto, variando sua intensidade desde ardor, coceira e irritação, podendo chegar até a corrosão e destruição do tecido. Todas estas reações se restringem à área em contato direto com a substância (BRASIL, 2015).

Quanto ao resultado apresentado no Gráfico 4, verifica-se que os três terpenos não demonstraram nenhum potencial irritante, assim como a Clorexidina, sendo mais uma vez classificados no nível 1, conclusivo de dano ausente.

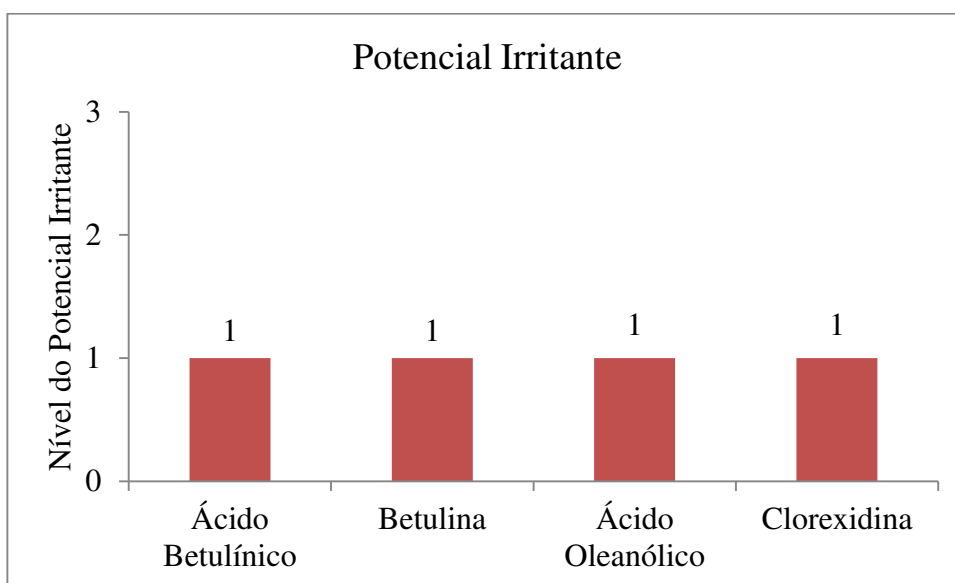


Gráfico 4- Nível do Potencial Irritante dos terpenos em comparação com a Clorexidina

Os resultados encontrados no presente estudo estão de acordo com o estudo desenvolvido por Zhang. (2008) comprovadores de que além dos efeitos benéficos, o ácido betulínico não apresenta potencial tóxico, nem irritante. Estudos como o de Barre et al. (1998) comprovam que os triterpenos presentes na *Lantana Camara* são substâncias que possuem bons efeitos e nenhum potencial tóxico ou irritante ao ser humano.

5 CONCLUSÃO

Os resultados obtidos no presente estudo evidenciaram que os terpenos: Ácido Betulínico, Betulina e Ácido Oleanólico apresentaram efeitos tão satisfatórios quanto o Digluconato de Clorexidina (0,12%), comprovando que estes compostos apresentam excelentes indicações para serem utilizadas como substâncias antimicrobianas em terapias nos humanos, visto que, quando utilizadas da maneira correta não possuem capacidade de desenvolver efeitos adversos como, efeitos irritantes, mutagênicos, tumorigênicos e danos ao sistema reprodutor humano. No entanto, os testes clínicos são fundamentais para a comprovação destes resultados.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABREU, P.A. **Receptor de NMDA: modelagem molecular por homologia e análise SAR de antagonistas de um potencial alvo terapêutico em doenças neurodegenerativas.** Dissertação do curso de Pós graduação em Neuroimunologia, Instituto de Biologia, Universidade Federal Fluminense, 2008.

AESCHBACH, R.; LOLIGER, J.; SCOTT, B. C.; MURCIA, A.; BUTLER, J.; HALLIWELL, B.; ARUOMA, O. I. Antioxidant actions of thymol, carvacrol, 6-gingerol, zingerone and hydroxytyrosol. **Food Chem. Toxicol.**, Oxford, v.32, p.31-36, 1994.

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.114-140, 2007.

ARNOUS, A. H.; SANTOS, A. S.; BEINNER, R. P. C. Plantas medicinais de uso caseiro – conhecimento popular e interesse por cultivo comunitário. **Rev. Esp. S.**, v.6, n.2, p.1-6, 2005.

AXELSSON, P.; LINDHE, J. The effect of a preventive programme on dental plaque, gingivitis and caries in schoolchildren. Results after one and two years. **J. Clin. Periodontol.**, Copenhagen, v.1, n. 2, p. 126- 138, 1974.

BARNES, D. G.; DOURSON, M. Reference dose (RfD): Description and use in health risk assessments. **Ann. rev. pharmacol. toxicol.**, v.8, p.471-486, 1988.

BUFFON, M. C. M.; PECHARKI, G. D.; MARIOT, C. A; GOMES, E. C. O uso de fitoterápicos em odontologia. **Rev. Pro-odonto**, ciclo 4, módulo 4, 2011.

CAI, L.; WU, C.D. Compounds from *Syzygium aromaticum* possessing growth inhibitory activity against oral pathogens. **J. Nat. Prod.**, v. 59: p. 987-990, 1996.

CHAPPELL, J. Biochemistry and molecular biology of the isoprenoid biosynthetic pathway in plants. **Annu. rev. plant physiol. plant mol. biol.**, Palo Alto, v.46, p.521-547, 1995.

CLARK, D. O. Pharmacokinetic studies in developmental toxicology: practical considerations and approaches. **Toxicol. Mech. Method.**, Philadelphia, v.3, p.223-251, 1993.

CURY, J. A. Controle Químico da Placa Dental. In: KRIGER, L. (Coord.). **Promoção de saúde bucal: Paradigma, Ciência, Humanização**. São Paulo: 3ed. Artes Médicas/ABOPREV, 2003, p. 141-151.

FEJERSKOV, O.; KIDD, E. **Cárie dentária. A doença e seu tratamento clínico**. São Paulo: Santos, 2005.

GARCIA, R.; ALVES, E. S. S.; SANTOS, M. P.; AQUIJE G. M. F. V.; FERNANDES, A. A. R.; SANTOS, R. B.; VENTURA, J. A.; FERNANDES, P. M. B. Antimicrobial activity and potential use of monoterpenes as tropical fruits preservatives. **Braz. j. microbiol.**, v.39, p.163-168, 2008.

GIL, A. C. C. **elab. proj. pesq.**, 4 ed. São Paulo: Atlas, 2002.

GLÓRIA, B. A. **Programa de Plantas Medicinais e Fitoterapia: Estruturas Secretoras nos Vegetais Superiores**. Edição Cursos Agrozootécnicos ESALQ-USP. Piracicaba. São Paulo, 1994, 81p.

GODOY, A. S. Introdução à pesquisa qualitativa e suas possibilidades. **Rev. Adm.**, São Paulo, v. 35, n. 2, mar./abr., 1995.

JIE LIU. Pharmacology of oleanolic acid and ursolic acid. **J.Ethnopharmacology.**, v.49, n.2, p.57-68, Dec.1995.

JULIÃO, L. S.; TAVARES, E. S.; LAGE, C. L. S.; LEITÃO, S. G. Cromatografia em camada fina de extratos de três quimiotipos de *Lippia alba* (Mill) N.E.Br. (erva-cidreira). **Rev. bras. Farmacogn**, São Paulo, v.13(Supl.), p.36-38, 2003.

KITCHENHAM, B. A.; PFLEEGER, S. L.; PICKARD, L. M.; JONES, P. W.; HOAGLIN, D. C.; EMAM, K. E.; ROSENBERG, J. Preliminary guidelines for empirical research in software engineering. **IEEE. Trans. Softw. Eng.**, v. 28, n.8, p. 721-734, 2002.

LIMA, G. R. Proposta de resolução específica para manipulação de plantas medicinais e fitoterápicos. Monografia (Ciências Farmacêuticas) - Brasília, Universidade de Brasília, 2006.

NUNAN, D. Research methods in language learning. **Ann. Hum. Genet.**, Cambridge, 1997

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

REBOREDO, M. M.; LUCINDA, L. M. F.; ROCHA, C. B.; QUEIROZ, G. T.; FARIA, V. C.; VIEIRA, V. A. Avaliação da toxicidade do extrato aquoso de *Caesalpinia férrea* em órgãos vitais, no sistema reprodutor e na produção de espermatozoides de ratos Wistar submetidos a tratamento subagudo. **Bol. Cent. Biol. Reprod.**, Juiz de Fora, v.26, p.11-17, 2007.

ROSSI, D.; BRUNI, R.; BIANCHI, N.; CHIARABELLI, C.; GAMBARI, R.; MEDICI, A.; LISTA, A.; PAGANETTO, G. Evaluation of the mutagenic, antimutagenic and antiproliferative potential of *Croton lechleri* Muell. **Arg.latex. Phytomedicine**, v. 10, p. 139-144, 2003.

SAMI, A.; TARU, M.; SALME, K.; JARI, Y. Pharmacological properties of the ubiquitous natural product betulin. **J. Europ. Pharmac. Sciences.**, v.29, n.1, p.1-13, Sep. 2006.

SANTOS, M. H. et al. Efeito de constituintes químicos extraídos do fruto de *Rheedia gardneriana* (Bacuparí) sobre bactérias patogênicas. **Rev. Bras. Farm.**, v.35, n.2, p.297-301, 1999.

SOUZA, A. C. Tratamento dos sintomas do climatério utilizando medicamento fitoterápico: estudo de revisão. Umuarama, 2009. 40f. Trabalho de conclusão de curso (Graduação) – Universidade Paranaense. 23.

TREVIZAN, M. A. et al. Acerca da dedicação do enfermeiro-chefe às atividades de assistência direta ao paciente. *Rev Paul Hosp*, v.28, n.8, p. 227-233, 1980.

SVENSATER, G.; BERGENHOLTZ, G. Biofilms in endodontic infections. **Endodontic topics**, v.9, p.27-36, 2004.

TRABULSI, L. R.; ALTERTHUM, F.; GOMPERTZ, O. F.; CANDEIAS, J. A. N. **Microbiologia**. 3ª edition. Rio de Janeiro, São Paulo, Belo Horizonte: 1999.

WAGNER, K. H.; ELMADFA, I. Biological relevance of terpenoids. **Ann Nutr Metab.**, Basel, v.47, p.95-106, 2003.

WILDERER, P. A.; CHARACKLIS, W. G. Structure and function of biofilms. In: CHARACKLIS, W. G.; WILDERER, P. A. **Structure and function of biofilms**. CHICHESTER, U. K: John Wiley, 1989, p. 5-17.


ZHANG, X.; LING L.; JI, Y.; FANG, G. Bioactivities of Betulinic Acid. **Col. L. Sciences**, Beijing 2008.

4 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os resultados obtidos no presente estudo evidenciaram que os terpenos: Ácido Betulínico, Betulina e Ácido Oleanólico apresentaram efeitos tão satisfatórios quanto o Digluconato de Clorexidina (0,12%), comprovando que estes compostos apresentam excelentes indicações para serem utilizadas como substâncias antimicrobianas em terapias nos humanos, visto que, quando utilizadas da maneira correta não possuem capacidade de desenvolver efeitos adversos como, efeitos irritantes, mutagênicos, tumorigênicos e danos ao sistema reprodutor humano. No entanto, os testes clínicos são fundamentais para a comprovação destes resultados.

Dessa forma pode-se concluir que, assim como a Clorexidina, excelentes substâncias isoladas de plantas estão sendo descobertas para desenvolvimento de terapias alternativas na odontologia, e testes *in silico* são de extrema importância para verificar a qualidade destes novos compostos, facilitando assim, a seleção de substâncias ideais para estudo *in vivo*, como também a fabricação de medicações fitoterápicas alternativas, tão eficientes quanto à Clorexidina no controle do biofilme bucal.

ANEXO A- NORMAS PARA PUBLICAÇÃO NA REVISTA INTERDISCIPLINAR EM SAÚDE




Revista Interdisciplinar Em Saúde


- [INÍCIO](#)
- [A REVISTA](#)
- [EDIÇÕES ANTERIORES](#)
- [CONSELHO CIENTÍFICO](#)
- [NORMAS PARA PUBLICAÇÃO](#)
- [EXPEDIENTE](#)
- [ERRATA](#)
- [CONTATO](#)


NORMAS PARA PUBLICAÇÃO DE ARTIGOS

1. Os textos devem conter no mínimo 10 e no máximo 15 laudas, redação em português; Resumo [cerca de 250 a 500 palavras] em português e inglês contendo: objetivo, método, resultados e conclusão. O resumo deve acompanhar ainda de três a cinco descritores cadastrados no Descritores de Ciências da Saúde (DCS). O título do texto deve ser escrito em português e inglês, seguido do nome de seu (s) autor (es), com breve apresentação [à guisa de currículo] em notas de rodapé. Máximo de seis autores por artigos;
2. O texto deve ser escrito em fonte Times New Roman, tamanho 12 e espaçamento 1,5; Número máximo de figuras: cinco; A página deve ser configurada para impressão em papel A4, contendo margens superior e esquerda iguais a 3 cm, inferior e direita iguais a 2 cm; A paginação deve ser inserida no canto superior direito;
3. Citações e referências devem estar de acordo com as normas da ABNT;
4. No caso de pesquisas envolvendo seres humanos deve ser anexado o parecer de aprovação por um comitê de ética em pesquisa;
5. Enviar dois arquivos: um contendo a identificação dos autores e outro sem. Ideias e conceitos neles contidos são de responsabilidade de seus autores;
6. Taxa de submissão R\$ 60,00 (sessenta reais) e publicação R\$ 140,00 (cento e quarenta reais). Conta para o depósito: Banco do Brasil - Agência: 1619-5 - Conta Poupança: 7508-6 - Variação 51 - em nome de Anália do Nascimento Andrade Feitosa;
7. Enviar os artigos para o e-mail: contato@interdisciplinaremsaude.com.br.

**FACULDADE
SANTA MARIA**







© Copyright 2014 - Revista Interdisciplinar em Saúde - Todos os direitos reservados
Desenvolvido por: AOG Designer

**ANEXO B- COMPROVANTE DE SUBMISSÃO DA REVISTA
INTERDISCIPLINAR EM SAÚDE**

Cajazeiras, 13 de maio de 2015

Aos Autores

Revista Interdisciplinar em Saúde
ISSN 2358 7490

Ref.: Submissão de artigo

O Corpo Editorial desta revista confirma a submissão do artigo intitulado “**ESTUDO DOS EFEITOS TÓXICOS DOS TERPENOS ÁCIDO BETULÍNICO, BETULINA E ÁCIDO OLEANÓLICO: UMA ABORDAGEM *IN SILICO***” de autoria de Clarissa de Moraes Martins Neri, Eduardo Bitu Pinto, Abrahão Alves de Oliveira Filho.

Atenciosamente,