UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
DEPARTAMENTO DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

VIVIAN MARIANO TORRES

ESTUDO MICROBIOLÓGICO E GALÊNICO DE FORMAS FARMACÊUTICAS PARA USO ODONTOLÓGICO CONTENDO *Eugenia uniflora* L.

RECIFE/2013

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
DEPARTAMENTO DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

VIVIAN MARIANO TORRES

ESTUDO MICROBIOLÓGICO E GALÊNICO DE FORMAS FARMACÊUTICAS PARA USO ODONTOLÓGICO CONTENDO *Eugenia uniflora* L.

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal de Pernambuco como pré-requisito para obtenção do grau de Mestre em Ciências Farmacêuticas.

Orientadora: Profa. Dra. Elba Lúcia Amorim
Co-orientador: Prof. Dr. Arquimedes Fernandes Monteiro de Melo

RECIFE/2013

Catalogação na fonte
Bibliotecária: Gláucia Cândida da Silva, CRB4-1662

T693e Torres, Vivian Mariano.
Estudo microbiológico e galênico de formas farmacêuticas para uso odontológico contendo Eugenia uniflora L. / Vivian Mariano Torres. – Recife: O autor, 2013.
76 folhas: il. ; 30 cm.

Orientadora: Elba Lúcia Amorim.
Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Pernambuco, CCS. Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, 2013.
Inclui bibliografia e anexos.

1. Dentifrícios. I. Amorim, Elba Lúcia (Orientadora). II. Título.

615.3 CDD (23.ed.) UFPE (CCS 2013-147)

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
PRÓ-REITORIA PARA ASSUNTOS DE PESQUISA E PÓS- GRADUAÇÃO
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
DEPARTAMENTO DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

Recife, 27 de agosto de 2013.

Defesa de Dissertação de Mestrado de **Vivian Mariano Torres** defendida e **APROVADA,** por decisão unânime, em 27 de agosto de 2013 e cuja Banca Examinadora foi constituída pelos seguintes professores:

PRESIDENTE E PRIMEIRA EXAMINADORA INTERNA: Prof.ª. Drª. Elba Lúcia Cavalcanti Amorim
(Depto. de Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal de Pernambuco - UFPE).

_____

PRIMEIRA EXAMINADORA EXTERNA: Prof.ª. Drª. Jane Sheila Higino
(Depto. de Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal de Pernambuco - UFPE).

_____

SEGUNDO EXAMINADOR EXTERNO: Prof. Dr. Tadeu José da Silva Peixoto Sobrinho
(Depto. de Fisiologia e Farmacologia da Universidade Federal de Pernambuco - UFPE).

_____

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO

Reitor

Professor Anisio Brasileiro De Freitas Dourado

Vice-Reitor

Professor Silvio Romero De Barros Marques

Diretor do Centro de Ciências da Saúde - CCS

Nicodemos Teles De Pontes Filho

Vice- Diretora do Centro de Ciências da Saúde - CCS

Vania Pinheiro Ramos

Chefe do Departamento de Ciências Farmacêuticas

Antonio Rodolfo De Faria

Vice-chefe do Departamento de Ciências Farmacêuticas

Dalci Jose Brondani

Coordenador da Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas

Almir Gonçalves Wanderley

Vice Coordenador da Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas

Ana Cristina Lima Leite

À minha amada avó, Josefa, *in memorian*, com muitas saudades. Aos meus filhos, Ana Júlia e Vinícius por ser a razão para tudo que eu faço. Ao meu mestre e companheiro destes últimos anos de jornada, Arquimedes, pela paciência e insistência.

AGRADECIMENTOS

À Deus.

À minha mãe, Valderiza, por ter acreditado nos meus sonhos e cuidado do meu filho, Vinícius, todos esses anos de ausência, estudos e trabalho.

Ao meu mestre, Drº Arquimedes Melo, por ter compartilhado seu conhecimento e experiência pacientemente, diante de tantas dificuldades.

A minha querida, Drª Jane Sheila, por sua disponibilidade, compreensão e afeto.

A minha querida orientadora, Drª Elba Lúcia, pelo desprendimento nesta investida e por acreditar no meu trabalho e dedicação.

A minha querida amiga, Drª Ana Catarina Simonetti, pelo incentivo e ajuda nos momentos de aflição.

Ao meu amigo, Msc. Risonildo Pereira, pelo incentivo e colaboração.

À Drª Ana Maria Souto Maior, pela compreensão e ajuda.

Ao meu colega de laboratório e amigo, Msc. Lucas Lobo, por me fazer acreditar que, apesar das dificuldades encontradas nesta jornada, não nasci para desistir.

Aos estudantes de graduação em Bacharelado em Farmácia, Cindy Aguilera, Maria Roosany Moura e André Volpini pela colaboração em alguns experimentos.

Ao Laboratório Escola da Faculdade ASCES, por permitir o desenvolvimento de alguns experimentos.

Ao Laboratório de Pesquisas Toxicológicas da Universidade Federal de Pernambuco, por ceder o espaço para desenvolvimento deste trabalho.

À Farmácia Roval de Manipulações, por permitir o desenvolvimento e manipulação das formas farmacêuticas deste estudo.

À Secretaria de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, por me atender sempre com tanta disponibilidade, gentileza e atenção.

Ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal de Pernambuco pela oportunidade da realização deste mestrado.

À todos que, embora não citados, colaboraram de alguma forma para a realização deste trabalho.

Muito Obrigada.

Não se esbarre na louça e repare no jardim, as plantas subindo ao Sol.
Nunca deixe de cantar a brisa e de voltar quando queira.
Não perca a altura do vôo nem se desvaneça.
O tempo é concreto e se você tem pressa não perca a cabeça.
É preciso que um dia se vá pra que outro dia amanheça.
Edson – Terezinha Fagá.

RESUMO

Eugenia uniflora L. é uma planta pertencente à família Myrtaceae, conhecida popularmente por pitanga cuja literatura tem demonstrado efeito antimicrobiano contra alguns microrganismos gram-positivos e fungos de importância clínica. Considerando a possibilidade da eficácia desta planta frente a microrganismo potencialmente cariogênicos nosso trabalho submeteu o extrato bruto seco (EBS) das folhas de *E. uniflora* L. a um estudo microbiológico para determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM) frente a *Streptococcus sanguis* (ATCC 15300), *Staphylococcus aureus* (ATCC 6538), *Candida albicans* (ATCC 10321), microrganismos de importância na área odontológica. Foi encontrada uma CIM = 1,56 mg/mL com halo de inibição de 11mm frente a *S. sanguis*, um resultado muito promissor, principalmente quando comparado ao controle positivo, gluconato de clorexidina, produto disponível no mercado para controle do biofilme oral. A partir destes resultados, foi dada continuidade ao trabalho com o desenvolvimento de formas farmacêuticas (dentifrício e enxaguatório bucal) para uso odontológico contendo extrato bruto seco das folhas de *E. uniflora* L. e estudo de estabilidade preliminar e acelerada dos produtos obtidos. Os parâmetros avaliados foram propriedades organolépticas e físico-químicas atendendo as Boas Práticas de Fabricação (BPF) e legislação vigente. Quanto às propriedades organolépticas não foi observada nenhuma alteração significativa de aspecto, cor e odor. Na avaliação de propriedades físico-químicas, parâmetros como pH e densidade mantiveram-se estáveis durante todo o estudo. Podemos concluir que as formas farmacêuticas obtidas foram compatíveis com o extrato bruto seco das folhas da pitanga e que podem ser utilizadas para realização de estudos de estabilidade de longa duração e avaliação clínica de eficácia.

Palavras chave: *Eugenia uniflora* L. Dentifrício. Enxaguatório bucal. Estabilidade. Pitanga.

ABSTRACT

Eugenia uniflora L. is a plant belonging to the family Myrtaceae, popularly known as cherry, whose literature has demonstrated antimicrobial activity against some gram-positive organisms and fungi from clinical significance. Considering the possibility that the efficiency of the plant against potentially cariogenic microorganism our work subjected the crude dry extract (EBS) from the leaves of *E. uniflora* L. a microbiological study to determine the minimal inhibitory concentration (MIC) against *Streptococcus sanguis* (ATCC 15300), *Staphylococcus aureus* (ATCC 6538), *Candida albicans* (ATCC 10321), importance of microorganisms in the dental field. We found a MIC = 1.56 mg / mL with a circle of inhibition of 11mm against *S. sanguis*, a result very promising, especially when compared to the positive control, chlorhexidine gluconate, product available in the market to control oral biofilm. From these results, we continued to work with the development of pharmaceutical dosage forms (toothpaste and mouthwash) for dental use containing crude extract of the dried leaves of *E. uniflora* L. and preliminary stability study and accelerated products obtained. We evaluated organoleptic and physico-chemical meeting the Good Manufacturing Practices (GMP) and applicable law. Regarding organoleptic properties observed no significant changes in appearance, color and smell. In the assessment of physico-chemical parameters such as pH and density remained stable throughout the study. We conclude that the pharmaceutical forms obtained were consistent with the crude extract of dried leaves of the cherry and can be used for studies of the long term stability and clinical effectiveness.

Keywords: *Eugenia uniflora* L. Dentifrice. Mouthwash. Stability. Cherry.

LISTA DE ABREVIATURA E SIGLAS

%	Por cento
CIM	Concentração mínima inibitória
EBS	Extrato bruto seco
EDTA	Ácido etileno diamino tetracético
EUL	*Eugenia uniflora* L.
g	Grama
mg	Miligrama
mL	Mililitro
ºC	Graus Celsius
OMS	Organização Mundial de Saúde
pH	Potencial hidrogeniônico
q.s.p	Quantidade suficiente para
r.p.m	Rotação por minuto
UFPE	Universidade Federal de Pernambuco

LISTA DE FIGURAS

Figura 01 – Folhas e frutos de *E. uniflora* L. 22

Figura 02 - Atividade antimicrobiana do extrato bruto seco das folhas de *Eugenia uniflora* L. sobre *S. sanguis*, nas concentrações de 50 mg/mL (1); 25 mg/mL (2); 12,5 mg/mL (3); 6,25 mg/mL (4); 3,12 mg/mL (5); 1,56 mg/mL (6); 0,78 mg/mL (7); 0,39 mg/mL (8) 48

Figura 03 - Atividade antimicrobiana do extrato bruto seco das folhas de *Eugenia uniflora* L. sobre *S. aureus*, nas concentrações de 50 mg/mL (1); 25 mg/mL (2); 12,5 mg/mL (3); 6,25 mg/mL (4); 3,12 mg/mL (5); 1,56 mg/mL (6); 0,78 mg/mL (7); 0,39 mg/mL (8) 49

Figura 04 - Atividade antimicrobiana do extrato bruto seco das folhas de *Eugenia uniflora* L. sobre *Candida albicans*, nas concentrações de 50 mg/mL (1); 25 mg/mL (2); 12,5 mg/mL (3); 6,25 mg/mL (4); 3,12 mg/mL (5); 1,56 mg/mL (6); 0,78 mg/mL (7); 0,39 mg/mL (8) 49

Figura 05 - Controle positivo do gluconato de clorexidina a 0,12% sobre *S. sanguis*, nas concentrações de 0,12% (1); 0,06% (2); 0,03% (3); 0,015% (4); 0,0075% (5); 0,0038% (6); 0,0019% (7); 0,0009% (8) 50

Figura 06 - Controle positivo do gluconato de clorexidina a 0,12% sobre *S. aureus*, nas concentrações de 0,12% (1); 0,06% (2); 0,03% (3); 0,015% (4); 0,0075% (5); 0,0038% (6); 0,0019% (7); 0,0009% (8) 51

Figura 07 - Controle positivo do gluconato de clorexidina a 0,12% sobre *Candida albicans*, nas concentrações de 0,12% (1); 0,06% (2); 0,03% (3); 0,015% (4); 0,0075% (5); 0,0038% (6); 0,0019% (7); 0,0009% (8) 51

LISTA DE TABELAS

Tabela 01 - Concentração inibitória mínima (CIM) em meio sólido do extrato de *Eugenia uniflora* L., sobre *Staphylococcus aureus, Streptococcus sanguis* e *Candida albicans* 48

Tabela 02 - Concentração inibitória mínima (CIM) em meio sólido do gluconato de clorexidina a 0,12% sobre *Staphylococcus aureus, Streptococcus sanguis* e *Candida albicans* 50

Tabela 03 - Formulações centesimais do dentifrício à base de extrato bruto seco (EBS) de *Eugenia uniflora* L. 53

Tabela 04 - Formulações centesimais do enxaguatório bucal contendo EBS das folhas de *Eugenia uniflora* L. 53

Tabela 05 - Avaliação do estudo de estabilidade preliminar e acelerado do enxaguatório bucal contendo extrato bruto seco das folhas de *Eugenia uniflora* L. 54

Tabela 06 - Avaliação do estudo de estabilidade preliminar e acelerado do dentifrício contendo extrato bruto seco das folhas de *Eugenia uniflora* L. 54

Tabela 07 - Avaliação do pH no estudo de estabilidade preliminar do enxaguatório bucal contendo extrato bruto seco das folhas de *Eugenia uniflora* L. 55

Tabela 08 - Avaliação do pH no estudo de estabilidade acelerada do enxaguatório bucal contendo extrato bruto seco das folhas de *Eugenia uniflora* L. 55

Tabela 09 - Avaliação do pH no estudo de estabilidade preliminar do dentifrício contendo extrato bruto seco das folhas de *Eugenia uniflora* L. 55

Tabela 10 - Avaliação do pH no estudo de estabilidade acelerada do dentifrício contendo extrato bruto seco das folhas de *Eugenia uniflora* L. 56

Tabela 11 - Avaliação da densidade em estudo de estabilidade preliminar do enxaguatório bucal contendo extrato bruto seco das folhas de *Eugenia uniflora* L. 57

Tabela 12 - Avaliação da densidade em estudo de estabilidade preliminar do dentifrício contendo extrato bruto seco das folhas de *Eugenia uniflora* L 57

Tabela 13 - Avaliação da densidade em estudo de estabilidade acelerada do enxaguatório bucal contendo extrato bruto seco das folhas de *Eugenia uniflora* L. 57

Tabela 14 - Avaliação da densidade em estudo de estabilidade acelerada do dentifrício contendo extrato bruto seco das folhas de *Eugenia uniflora* L 58

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO 17

2 REVISÃO DE LITERATURA 20

2.1 FITOTERAPIA E INFORMAÇÕES RELEVANTES DA ATUALIDADE. 20

2.2 *Eugenia uniflora* L. (Myrtaceae) 21

2.3 BIOFILME 25

2.4 CAVIDADE BUCAL 26

2.5 TECNOLOGIA FARMACEUTICA 28

2.6 CONTROLE DE QUALIDADE DE PRODUTOS FARMACÊUTICOS 31

2.7 CONTROLE NA PRODUÇÃO DE MEDICAMENTOS 31

2.8 VALIDAÇÃO DE MÉTODOS ANALÍTICOS 34

2.9 ESTUDO DE ESTABILIDADE 34

3 OBJETIVOS 37

3.1 OBJETIVO GERAL 37

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS 37

4 MATERIAL E MÉTODOS 39

4.1 ESTUDOS FITOQUÍMICOS 39

4.1.1 Prospecção dos constituintes químicos do EBS de *E. uniflora* L. 39

4.1.2 Obtenção do EBS das folhas de *E. uniflora* L. 39

4.1.3 Teste qualitativo para fenóis e taninos 40

4.1.4 Prospecção da determinação de cinzas totais da matéria-prima 40

4.1.5 Determinação de cinzas totais 40

4.1.6 Prospecção da determinação de água da matéria-prima 40

4.1.7 Determinação de água em drogas vegetais 40

4.2 ESTUDOS MICROBIOLÓGICOS 41

4.2.1 Preparação do inóculo 41

4.2.2 Determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM) do EBS das folhas de *E. uniflora* L. 41

4.3 ESTUDOS GALÊNICOS 41

4.3.1 Prospecção do desenvolvimento do dentifrício contendo EBS das folhas de *E. uniflora* L. 41

4.3.2 Técnica preparatória do dentifrício contendo EBS das folhas de *E. uniflora*

L. 42
4.3.3 Prospecção do desenvolvimento do enxaguatório bucal contendo EBS das folhas de *E. uniflora* L. 42
4.3.4 Técnica preparatória do enxaguatório bucal contendo EBS das folhas de *E. uniflora* L. 42
4.4 CONTROLE DE QUALIDADE DO PRODUTO ACABADO 42
4.4.1 Prospecção para estudo de estabilidade preliminar e acelerada das formas farmacêuticas para uso odontológico contendo o EBS das folhas de *E.uniflora* L. 42
4.4.2 Estudo de Estabilidade Preliminar 43
4.4.3 Estudo de Estabilidade Acelerada 43
4.4.4 Propriedades Organolépticas 43
4.4.5 Propriedades físico-químicas 44
4.4.6 pH 44
4.4.7 Densidade 44
4.4.8 Ciclo gele-degelo e centrífuga combinados 44
4.4.9 Viscosidade 45
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO 47
6 CONCLUSÃO 60
REFERÊNCIAS 63
ANEXOS 73
ANEXO A – Representação gráfica da avaliação do pH no estudo de estabilidade preliminar do enxaguatório bucal contendo extrato bruto seco das folhas de *E. uniflora* L. 72
ANEXO B – Representação gráfica da avaliação do pH no estudo de estabilidade acelerada do enxaguatório bucal contendo extrato bruto seco das folhas de *E. uniflora* L.. 72
ANEXO C – Representação gráfica da avaliação do pH no estudo de estabilidade preliminar do dentifrício contendo extrato bruto seco das folhas de *E. uniflora* L. 73
ANEXO D – Representação gráfica da avaliação do pH no estudo de estabilidade acelerada do dentifrício contendo extrato bruto seco das folhas de *E. uniflora* L. 73
ANEXO E – Representação gráfica da avaliação da densidade em estudo da estabilidade preliminar do enxaguatório bucal contendo extrato bruto seco das folhas de *E. uniflora* L. 74

ANEXO F – Representação gráfica da avaliação da densidade em estudo da estabilidade preliminar do enxaguatório bucal contendo extrato bruto seco das folhas de *E. uniflora* L. 74
ANEXO G – Representação gráfica da avaliação da densidade em estudo da estabilidade acelerada do enxaguatório bucal contendo extrato bruto seco das folhas de *E. uniflora* L. 75
ANEXO H – Representação gráfica da avaliação da densidade em estudo da estabilidade acelerada do dentifrício contendo extrato bruto seco das folhas de *E. uniflora* L. 74

1 INTRODUÇÃO

1 INTRODUÇÃO

Uma vez que a flora brasileira possui uma imensa biodiversidade, existe um grande incentivo para a utilização de plantas medicinais, cujo potencial econômico e tecnológico é relevante (Brasil, 2000). Os medicamentos fitoterápicos abrangem um programa alternativo de produção e utilização de produtos originados de plantas medicinais para tratamento e prevenção de doenças com baixo custo e efetividade necessária (Melo, 2006a).

Eugenia uniflora L., conhecida popularmente por 'pitanga' pertence à família Myrtaceae, uma família botânica que compreende 130 gêneros e cerca de 3.000 espécies, é uma planta arbórea e frutífera. A 'pitanga' possui diversas atividades farmacológicas devido a presença de carotenóides, flavonóides e taninos (Pereira, 1997; Volpato, et al, 2002). Pesquisadores demonstraram atividade antibacteriana das folhas de *E. uniflora* L. frente a *Bacillus cereus*, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* e *Pseudomonas aeruginosa.* (Ogunwande, et al, 2005).

Atualmente tem-se usado frequentemente produtos naturais a fim de prevenir doenças em decorrência de suas propriedades farmacológicas, principalmente antimicrobianas (Feijó, et al, 2009) e um grande número de estudos vem sendo desenvolvido em todo o mundo, para avaliação de compostos químicos no controle da placa bacteriana ou biofilme oral. Os dentes presentes na cavidade oral possuem uma superfície dura e não descamativa que favorece a proliferação de depósitos bacterianos, os quais constituem a placa dental ou bacteriana ou, mais recentemente, biofilme oral (Almeida, et al, 2002). O biofilme, cujo termo foi introduzido em 1978 por Costerton (Perez, 2005), tem sido definido como comunidades de agregados bacterianos inter-relacionados que se encontram sobre a superfície dental, originando uma biopelícula circundada por uma matriz de polímeros de origem bacteriana e salivar, a qual pode ser biologicamente ativa e reter nutrientes, água e enzimas essenciais (Marsh, 2004). Um grande número de estudos vem sendo desenvolvido em todo o mundo, para avaliação de compostos químicos no controle do biofilme oral. Ele é diretamente responsável pelo desencadeamento das periodontoses assim como da cárie (Newbrun, 1989).

A remoção da placa faz-se por meios mecânicos, químicos ou ambos, os quais previnem a sua recorrência e promovem a redução de seu potencial patogênico. Os inibidores químicos da placa incorporados em colutórios e dentifrícios atuam como agentes auxiliares das técnicas mecânicas, portanto devem ser prescritos de acordo com a necessidade do paciente (Carranza Júnior, 1992).

As primeiras pastas dentifrícias surgiram no final do século XIX. Em 1873 apareceram pela primeira vez no mercado norte americano. Até o final dos anos 40–50, essa forma farmacêutica não teve grande aceitação por parte dos consumidores em virtude do seu elevado custo. Sabe-se que uma das funções básicas do dentifrício é a de eliminar o biofilme. Outra função importante é a de conter substâncias protetoras específicas (Charlet, 1996; Melo, 2002). A eficácia das plantas medicinais como componente, tanto nos dentifrícios como nos enxaguatórios bucais, tem sido investigada para o tratamento de gengivites (Cordeiro, 2006). Baseado neste contexto e na importância do controle do biofilme oral na prevenção de afecções na mucosa oral, o objetivo do nosso trabalho foi desenvolver formas farmacêuticas, dentifrício e enxaguatório bucal, seguros e eficazes, dotados de atividade antibiótica frente a microrganismos potencialmente cariogênicos, contendo extrato bruto seco das folhas de *Eugenia uniflora* L. para prevenção de formação e diminuição do biofilme oral.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2 REVISÃO DE LITERATURA

O conhecimento e o uso das plantas do ponto de vista empírico denominam-se medicina popular ou tradicional. A origem da medicina tradicional se deu através da observação e prática das pessoas em busca de solução para os males que acometiam cada comunidade. Baseado neste conhecimento empírico é que diversas populações utilizam as plantas com objetivo de cura. Em regiões sub-desenvolvidas, nas quais a medicina convencional não está totalmente disponível, o tratamento tradicional ainda permanece como a principal forma de terapia para o diabete (VOLPATO, et al, 2002).

2.1 FITOTERAPIA E INFORMAÇÕES RELEVANTES DA ATUALIDADE.

A associação de um desapontamento com medicamentos convencionais ao desejo de um estilo de vida "natural" resultou no uso crescente de medicamentos complementares e alternativos (MCAs) no mundo desenvolvido (Barnes, et al, 2012). As estimativas de gastos com produtos fitoterápicos variam, mas os dados mostram que o mercado global de produtos fitoterápicos cresceu rapidamente na última década. Nos EUA, as vendas anuais no varejo foram estimadas em U$$ 1,6 bilhões em 1994 e quase U$$ 4 bilhões em 1998 (Brevoort, 1996; Brevoort, 1998). A estimativa para o mercado mundial de drogas de origem vegetal chega a 12,4 bilhões e o consumo somente no continente Europeu seria responsável por 50% deste mercado (Guerra e Nodari, 2004).

A Organização Mundial de Saúde (OMS) conduziu um recente levantamento global sobre o controle regulatório dos medicamentos fitoterápicos e relatou resultados de 141 países. Esse levantamento confirma que, durante esses últimos anos, vários países definiram ou iniciaram o processo para estabelecer uma política nacional e regulamentar para os medicamentos fitoterápicos (Who, 2003; Who, 2004; Who, 2004, Anon, 2005). No Brasil, algumas iniciativas foram a publicação da "Lista de Registro Simplificado de Fitoterápicos" através da Re nº 89, de 16 de março de 2004, do " Guia para a realização de estudos de toxicidade pré-clínica de fitoterápicos" através da Re nº 90, de 16 de março de 2004 e do "Guia para a realização de alterações, inclusões, notificações e cancelamentos pós registro de fitoterápicos" através da Re nº 91, de 16 de março de 2004 (Brasil, 2004; Brasil, 2004; Brasil, 2004).

2.2 *Eugenia uniflora* L. (Myrtaceae)

Informações botânicas

Eugenia uniflora L. é uma planta Magnoliidae, da família Myrtaceae a qual possui várias espécies frutíferas brasileiras importantes: jabuticabas, cambucis, pitangas, cambucás, gabirobas, cambuís, araçás, grumixamas, guabijus, jambolão e tantas outras. Os principais constituintes químicos dessas plantas são óleos voláteis, triterpenos, taninos, ácidos fenólicos, ésteres e outros, sendo que glicosídeos e alcalóides são raros. *E. uniflora* é uma das 14 espécies do gênero *Eugenia*, originária do Brasil, podendo ser encontrada desde o Nordeste até o Sul do país (Evans, 1996; Cirqueira & Alves, 2005). Geralmente, ultrapassa a fronteira chegando à Argentina, Paraguai e Uruguai. A pitangueira é uma árvore relativamente pequena que nas regiões subtropicais alcança de 2 a 4m de altura, mas vegetando sob ótimas condições de clima e solo, pode alcançar até 10 m de altura quando adulta. Apresenta tronco irregular, ramificado, de cor avermelhada. Suas folhas são simples, de consistência herbácea e superfície lisa, possui forma elítica com ápice cuspidado e base obtusa, disposição oposta, coloração avermelhada quando jovens e verde quando adultas, são brilhantes e possuem aroma característico quando sofre processos do tipo maceração. As flores brancas e suavemente perfumadas são hermafroditas e melíferas. Na época da frutificação, a árvore se transforma, seus ramos ficam completamente pintados de um vermelho brilhante, atraindo grande quantidade de pássaros. Seus frutos são considerados digestivos se consumidos após as refeições. Quando as sementes estão prontas para germinar, os frutos amadurecem, e podem se abrir, liberando as sementes ao solo, ou tornam-se aptos a serem ingeridos por animais. Os frutos carnosos, normalmente dependem de animais, que carregam os frutos para outros lugares, ou os ingerem, e carregam suas sementes no trato digestivo para serem liberadas longe do local de origem. (Melo & Torres, 2009).

Figura 01- Folhas e frutos de *E. uniflora* L.

Componentes químicos ativos

O gênero *Eugenia* é considerado um dos maiores da família Myrtaceae e assumem um destaque especial, por fornecer extratos utilizados na medicina tradicional como agentes antimicrobianos, antiinflamatórios, antidiabéticos, nas arritmias ou insuficiência cardíaca, entre outras aplicações. Estudos químicos com espécies *Eugenia* revelaram, a presença de flavonóides, taninos, terpenóides e óleos essenciais, sob o ponto de vista farmacológico, estudos realizados com extratos brutos e compostos comprovaram atividades antiinflamatória, analgésica, antifúngica, antipirética e antioxidante (Oliveira, et al, 2006; Victoria, et al, 2012).

As folhas de *Eugenia uniflora* apresentam como principais constituintes o furanodieno/furanoelemeno, β-elemeno, α-cadinol, (E-E)-germacrono, (-)-selina-1,3,7(11)-trien-8-one, galocatequina, entre outros (Melo, et al, 2007; Kanazawa, et al, 2000; Lee, et al, 1997). Os frutos também apresentam consideráveis quantidades de componentes ativos, entre eles estão o licopeno, rubixantina, *cis*-rubixantina, β-cryptoxantina, *cis*-licopeno, β-caroteno, γ-caroteno, zeaxantina, luteina, violaxantina e β-caroteno-5,6-epoxido (Shami, et al, 2004; Filho, et al, 2008).

Os principais componentes desta planta são carotenóides, flavonóides, taninos e outros compostos fenólicos (Shami, et al, 2004). Os compostos fenólicos são produtos secundários do metabolismo vegetal que apresentam um anel aromático com uma ou mais hidroxilas em sua estrutura que lhes conferem um poder redutor (Melo, et al, 2006). Os principais compostos fenólicos são ácidos fenólicos, flavonóides e taninos e sua maioria exibe propriedades farmacológicas (Moller, et al, 2009). Dentre eles, os flavonóides pertencem a um grande grupo de fitoquímicos ou fitonutrientes, que são polifenóis de baixa massa

molecular, encontrados em diversas plantas**.** Possuem propriedades antioxidantes, antinflamatória e antitumoral. Os taninos são polifenóis de origem vegetal, com peso molecular geralmente entre 500 e 3000 daltons. São hidrossolúveis, e insolúveis em éter, clorofórmio e benzeno. Podem ser precipitados por sais de metais pesados. O termo é largamente utilizado para designar qualquer grande composto polifenólico contendo suficientes grupos hidroxila e outros (como carboxila) para poder formar complexos fortes com proteínas e outras macromoléculas. São geralmente divididos em dois tipos: hidrolisáveis e condensados. No centro de uma molécula de um tanino hidrolisável existe um carboidrato poliol (geralmente D-glicose). Os grupos hidroxila dos carboidratos encontram-se parcial ou totalmente esterificados com grupos fenólicos como o ácido gálico (nos galotaninos) ou ácido elágico (nos elagitaninos). Estes taninos são hidrolisados por ácidos ou bases fracos produzindo-se carboidrato e ácidos fenólicos. Este tipo de tanino é encontrado nas folhas e súber de muitas espécies de plantas. Os taninos condensados, também conhecidos como protoantocianidinas, são polímeros de 2 a 50 (ou até mais) unidades flavonóides ligadas por ligações carbono-carbono, as quais não são susceptíveis de serem rompidas por hidrólise. Apesar de muitos dos taninos condensados serem hidrossolúveis, alguns taninos condensados de grande dimensão são insolúveis na água. Os taninos podem ser utilizados como antidoto em casos de intoxicação com metais pesados e alcalóides devido ao seu poder de complexação e antioxidante devido sua capacidade sequestrante de oxigênio (Okuda, 2005; Costa, et al, 2008).

Alguns efeitos relacionados aos constituintes ativos da pitanga já foram descritos, como por exemplo, o controle da hiperglicemia onde foi possível observar que extrato etanólico de *Eugenia uniflora* L. possui efeito inibitório dose-dependente na atividade da lipase, enzima que atua no metabolismo de carboidratos e lipídios (Grover, et al, 2002). As folhas de ‘pitanga’ também são usadas para o tratamento de gota, isto se deve a presença de flavonóides com capacidade antioxidante, estes compostos possuem atividade inibitória xantino-oxidase o que justifica seu uso frente a esta enfermidade (Kade, et al, 2008). O carcinoma nasofaríngeo é um tumor maligno provocado muitas vezes por infecções causadas pelo Vírus Epstein-Barr. Este é um tipo de Herpes Vírus que ataca células B. A *Eugenia uniflora* tem sido relatada como ativa contra o EBV. Por esta razão foram isolados quatro taninos das folhas de ‘pitanga’ para investigar a inibição da EBV DNA polimerase. Destes, dois apresentaram atividade anti-EBV, eugeniflorina D_1 com uma IC_{50}= 3,0 μM e eugeniflorina D_2 com IC_{50}= 3,5 Mm (Lee, et al, 2000).

Uma classe abundante presente nas folhas e frutos desta planta são os sesquiterpenóides. Estes constituintes conferem a *Eugenia* efeito antibacteriano contra *Staphylococcus aureus* e inibição do crescimento de *Baccilus cereus* com uma concentração mínima inibitória (CMI) de 39 µg/ml (Ogunwande, et al, 2005). O extrato bruto de *Eugenia uniflora* L. também demonstra atividade antifúngica contra *Paracoccidioides brasiliensis* (Splendore) Almeida com uma Concentração Mínima Inibitória (CMI) igual a 750 mg/ml devido a presença destes constituintes (Santos, et al, 2004). O óleo essencial de *Eugenia* apresenta excelente citotoxicidade frente a células tumorais humanas. Estes dados são muito promissores como uma possibilidade futura para quimioterapia antineoplásica a partir de constituintes isolados do óleo de *Eugenia uniflora* L. (Ogunwande, et al, 2005).

O ácido aleanólico é uma substância presente em algumas espécies de *Eugenia*, ele possui diversas atividades recentemente conhecidas, vale citar que inibe as lípases, glicerol fosfato-desidrogenase, DNA-ligases e kinases AMP-c dependentes; tem atividade anticolesterolêmica, anti-hepatotóxica, antioxidante, antiinflamatória, antifúngica, antibiótica e inibe o crescimento de tumores e patógenos orais. O ácido oleanólico ainda antagoniza a ação da interleucina 8/CINC, age contra a psoríase, protege a pele da ação da luz, reverte a resistência da leucemia P388 à vinblastina, tem efeito antagonista em choques anafiláticos e finalmente inibe a dimerização da protease do HIV-1(Liu, 1995; Ohkubo & Shibata, 1997; Krishnaswamy & Raghuramulu, 1998; Hong, et al, 1999; Ahmed, et al, 2000; Kelecom, et al, 2002).

Toxicidade

O mecanismo de ação pelo qual as plantas baixam a taxa de glicose do sangue pode ser atribuído aos seguintes fatores: aumento da liberação de insulina através da estimulação das células β-pancreáticas; resistência aos hormônios que aumentam a taxa de glicose; aumento do número e da sensibilidade do sítio receptor de insulina; diminuição da perda do glicogênio; aumento do consumo de glicose nos tecidos e órgãos; eliminação de radicais livres; resistência a peroxidação dos lipídios; correção da desordem metabólica causada em lipídios e proteínas e estímulo ao aumento da microcirculação do sangue no organismo. (Marles, Farnsworth, 1995; Huo, et al, 2003; Said, et al, 2002; Li, et al, 2004; Volpato, et al, 2002; Negri, 2005; Pereira, 1997). A toxicidade é influenciada pela parte da planta utilizada na preparação do extrato, método de preparação e via de administração. Devido à presença de

alguns polifenóis, que são agentes antidiabéticos, pode ocorrer hipoglicemia como efeito colateral (Negri, 2005).

2.3 BIOFILME

A boca está continuamente banhada pela saliva, mantendo uma temperatura de 35-36ºC e um pH de 6,75-7,25. A composição iônica da mesma é responsável por sua capacidade para remineralizar o esmalte. Além disso, seus componentes orgânicos (como glicoproteínas e proteínas) podem influir no estabelecimento e seleção da microflora oral e atuar como nutrientes endógenos (Scannapieco, 1994).

A microbiota bucal é determinante tanto na manutenção da saúde oral como na ocorrência de complicações resultantes de distúrbios no referido ecossistema, estando a complexidade deste último intrinsecamente relacionada com a idade e imunocompetência do hospedeiro, disponibilidade de novos nichos, mudanças na dieta, qualidade e freqüência da higiene oral e exposição a flúor (Kolembrander, 2000; Marcotte; Lavoie, 1998). Essa idéia é sustentada pela hipótese da placa ecológica, proposta por Marsh (Marsh, 1994). Os dentes presentes na cavidade oral possuem uma superfície dura e não descamativa que favorece a proliferação de depósitos bacterianos, os quais constituem a placa dental ou bacteriana ou, mais recentemente, biofilme oral (Almeida, et al, 2002).

O biofilme, cujo termo foi introduzido em 1978 por Costerton (Perez, 2005), tem sido definido como comunidades de agregados bacterianos inter-relacionados que se encontram sobre a superfície dental, originando uma biopelícula circundada por uma matriz de polímeros de origem bacteriana e salivar, a qual pode ser biologicamente ativa e reter nutrientes, água e enzimas essenciais (Marsh, 2004). Essas comunidades se aderem a diversas superfícies, num meio aquoso com concentração suficiente de nutrientes para sustentar suas necessidades (Perez, 2005). Sendo assim, é perceptível que as bactérias orais não existem como entidades independentes, mas funcionam preferivelmente como uma comunidade microbiana coordenada, espacialmente organizada e metabolicamente integrada (Marsh, 2004).

A placa dental, no decorrer do tempo, converte-se numa estrutura organizada espacialmente na qual os microrganismos ocupam posições definidas segundo suas propriedades biológicas e físicas (Marsh, 2004). Uma de suas características primordiais é a manutenção de uma microflora estável num meio que é variável (Perez, 2005). Esta justaposição estável das células bacterianas com outras, seja de espécie igual ou diferente, juntamente com a grande produção de matriz de exopolissacarídeos, dentro da biopelícula em

desenvolvimento, condicionam o microambiente de cada biopelícula (Costerton, et al, 1995). Os exopolissacarídeos resultantes consistem num grupo heterogêneo de substâncias que proporcionam a adesão dos microrganismos às superfícies e aumentam a resistência do biofilme às forças de separação (Zobell, 1943). Dentre os fatores que ajudam a conformar a estrutura da placa e estabelecer a eventual justaposição, destaca-se a cooperação fisiológica (Costerton, et al., 1994).

Atualmente tem-se usado frequentemente produtos naturais a fim de prevenir doenças em decorrência de suas propriedades farmacológicas, principalmente antimicrobianas (Feijó, et al, 2009.). Entretanto, antes de desenvolver algum método terapêutico para prevenção ou tratamento da placa bacteriana e, subsequentemente, doenças relacionadas, é importante levar em consideração que o crescimento bacteriano na placa dental exibe uma resistência aumentada a agentes antimicrobianos, inclusive àqueles utilizados em dentifrícios e enxaguantes bucais. Além disso, a estrutura do biofilme pode restringir a penetração do agente antimicrobiano (Marsh, 2004).

2.4 CAVIDADE BUCAL

A boca mantém condições ótimas para o crescimento de muitos microorganismos. Os componentes orgânicos presentes na saliva podem influenciar no estabelecimento e seleção da microbiota oral favorecendo a adesão de certos microrganismos através da formação de uma película sobre a superfície do esmalte. Além disso, pode atuar através de componentes da imunidade inata e adquirida que têm a capacidade de inibir diretamente alguns microrganismos exógenos (Scannapieco, 1994).

Um grande número de estudos vem sendo desenvolvido em todo o mundo, para avaliação de compostos químicos no controle da placa bacteriana ou biofilme. A placa consiste de um depósito bacteriano em uma matriz composta principalmente por polímeros extracelulares de origem bacteriana e produtos de exsudatos do sulco gengival e saliva. A placa bacteriana é diretamente responsável pelo desencadeamento das periodontoses assim como da cárie (Newbrun, 1989).

A etiologia da cárie e da doença periodontal é multifatorial; essas doenças ocorrem com a presença de microrganismos, tais como, *Streptococcus mitis, Streptococcus mutans, Streptococcus sanguis*, bactérias predominantemente cariogênicas (Marsh, 1994). Espécies de *Candida* podem estar envolvidas em várias formas de doenças orais, como candidíase oral, queilite angular, infecções endodônticas e periodontite, sendo *Candida albicans* a espécie

comumente associada às lesões orais (Bahna, et al, 2007; Lawrence, et al, 2008). Como microrganismo patógeno oportunista relevante na cavidade bucal, cita-se *Staphylococcus aureus*. Esta bactéria gram-positiva tem a capacidade de atuar como uma microbiota suplementar, sendo frequentemente encontrada em abcessos periapicais e estomatites protéticas (Soares, et al, 2006). A aderência desses microrganismos à superfície dental depende das interações físico-químicas entre as bactérias e a película adquirida do esmalte pela produção de polissacarídeos extracelulares de alto peso molecular bem como uma elevada capacidade de aderência. Ao longo dos anos e com o avanço das pesquisas, as teorias propostas em relação ao papel da placa bacteriana no início da cárie têm evoluído. A 'hipótese da placa específica' considerava que a microflora bacteriana residente na placa compreendia uma variedade de organismos, só algumas espécies estavam ativamente comprometidas com o desenvolvimento da enfermidade. Posteriormente, foi proposta a 'hipótese da placa não-específica' a qual referia que a cárie dental era resultado da atividade global da microflora total da placa. Desta forma, a combinação heterógena de microrganismos favoreceria o desenvolvimento da doença. A 'hipótese da placa ecológica' proposta recentemente concilia os principais elementos das hipóteses anteriores. Os organismos relacionados com a doença podem estar presentes também nos sítios sadios, entretanto em níveis baixos, que não são clinicamente relevantes. A doença viria a ser o resultado das mudanças ocorridas no balanço da microflora (microbiota, microflora está em desuso) que reside na placa como conseqüência da modificação das condições ambientais local (Marsh, 1994; Perez, 2005).

O conceito de que a cárie dental se origina como resultado da perturbação do meio ambiente do habitat microbiano traz como elemento implícito importante que a doença pode ser prevenida não só atacando diretamente os patógenos associados como também interferindo com os fatores responsáveis pelo seu crescimento (Perez, 2005).

Condições regulares de ingestão de açucares e pH baixo, parecem ser os mecanismos primários que rompem a homeostasia microbiana. Algumas estratégias de prevenção, segundo os princípios da hipótese da placa ecológica incluem: (a) inibição da produção de ácido; (b) interferência no desenvolvimento da biopelícula; (c) evitar a ingestão de açúcares fermentados entre as comidas; (d) consumir alimentos e bebidas que contenham açúcares não-fermentados; (e) estimular o fluxo salival depois das principais refeições (Hanham, 2001 apud Perez, 2005).

A remoção do biofilme faz-se por meios mecânicos, químicos ou ambos, os quais previnem a sua recorrência e promovem a redução de seu potencial patogênico. Diversas doenças bucais estão associadas ao acúmulo do biofilme oral, como cárie, doença periodontal e infecções por *Cândida* spp. Atualmente, dentre os agentes químicos utilizados no combate

das afecções bucais, destaca-se o gluconato de clorexidina, que tem sido indicado pela sua eficácia comprovada na remoção química do biofilme cariogênico ou periodontopatogênico. Os inibidores químicos da placa incorporados em colutórios e dentifrícios atuam como agentes auxiliares das técnicas mecânicas, portanto devem ser prescritos de acordo com a necessidade do paciente (Carranza Júnior, 1992; Heasman & Seymor, 1994; Marinho, et al, 2003; Lawrence, et al, 2008; Borba, et al, 2008; Jovito, et al, 2009).

Diversas substâncias químicas tais como anti-sépticos de amplo espectro de ação, antibióticos específicos, enzimas que afetam a matriz e a estrutura da placa, fluoretos, sais de metais e agentes oxidantes tem sido utilizados e ensaiados quanto a capacidade de prevenir ou limitar o acúmulo da placa bacteriana e doenças induzidas por ela. O gluconato de clorexidina é um detergente catiônico de amplo espectro antimicrobiano colocado a disposição da prática clínica odontológica e se mostra efetivo na inibição da formação da placa seja em solução ou gel, no entanto, a clorexidina quando usada por longo período, apresenta efeitos colaterais indesejáveis como manchas nos dentes, próteses, restaurações e língua, disgeusia e descamação da mucosa bucal, o que torna o seu uso restrito (Stefani Lima,1996; Noiri, et al, 2003; Marinho, et al, 2003). Estudos mais recentes demonstram o uso da clorexidina na forma de verniz, restringindo a sua ação aos sítios mais susceptíveis minimizando os efeitos adversos (Ueno, 2001).

2.5 TECNOLOGIA FARMACEUTICA

As preparações farmacêuticas semi-sólidas tem como principal propriedade a capacidade de adesão à superfície de aplicação por um período razoável de tempo antes de serem removidas por lavagem ou devido ao uso. Esta adesão deve-se ao seu comportamento reológico plástico, que permite aos semi-sólidos manter sua forma além de aderir como um filme até a aplicação de uma força externa. Os cremes, por exemplo, são sistemas semi-sólidos emulsionados de aparência opaca. A sua consistência e caráter reológico dependem do fato da emulsão ser do tipo água em óleo (A/O) ou óleo em água (O/A) bem como da natureza dos sólidos na fase interna. Os géis também são sistemas semi-sólidos onde uma fase líquida está confinada dentro de uma matriz polimérica tridimensional em que um elevado grau de reticulação física foi introduzido. Os géis são preparados por um processo de fusão ou, por um procedimento especial requerido pelas características de gelificação do gelante. A maioria destas preparações semi-sólidas são aplicadas na pele, onde servem habitualmente como

veículos a fármacos de aplicação tópica. Uma pequena porção das formas semi-sólidas é aplicada em membranas mucosas (Lachmann, et al, 2001).

Há mais matérias-primas disponíveis para uso na pele do que para uso oral. A diferença deve-se ao tipo de barreira de absorção e ao ambiente físico-químico que rodeia os sítios de absorção. Alguns componentes são fundamentais para obtenção de uma forma farmacêutica semi-sólida, os emulgentes, umectantes e conservantes são alguns exemplos. Os emulgentes são utilizados para conferir certa consistência ao creme, principalmente. A viscosidade do creme evita a coalescência das fases emulsionadas e ajuda a estabilizar a emulsão, por isso, quase todos os cremes semi-sólidos emulsionados requerem mais que um emulgente. O sabão estearato de trietanolamina combinado com álcool cetílico é um exemplo de emulgente misto de O/A. A escolha do umectante é baseada não apenas na velocidade da troca de umidade, mas também no seu efeito de textura e viscosidade da preparação. Estes materias evitam que o creme seque, que ocorra a formação de crosta, melhoram a consistência, a aplicação do creme na pele, permitindo que o creme se espalhe sem rolar. O propilenoglicol e os polietilenoglicóis são usados ocasionalmente em conjunção com a glicerina, uma vez que a sua capacidade de absorção de umidade é menor do que a capacidade de absorção de umidade da glicerina. Os conservantes são adicionados aos semi-sólidos para prevenir a contaminação, deterioração e destruição por alguns microrganismos, uma vez que muitos dos componentes destas formulações servem de substratos para estes. (Lachmann, et al, 2001).

Os géis são sistemas semi-sólidos que consiste na dispersão das molécula ativas em um veículo líquido que adquire consistência semelhante à gelatina pela ação de uma substância adicionada a ele, como carboximetilcelulose (Ansel, et al, 2000). Existem duas classes de géis: géis hidrofóbicos ou oleogéis que geralmente consistem em uma parafina líquida com polietileno ou óleos gordurosos gelificados com sílica coloidal e géis hidrofílicos ou hidrogéis, cujas bases geralmente consistem em água, glicerol ou propilenoglicol gelificados com agentes gelificantes adequados como polímeros de carboxivinil (Gennaro, 2004). O tipo de polímero empregado na formulação do gel pode influenciar no comportamento reológico desta e, portanto, pode influenciar na estabilidade física do produto, assim como, o seu comportamento sobre a pele (Corrêa, et al, 2005). Expostos estes conceitos sobre creme e gel podemos expor que erroneamente o dentifrício vem sendo designado como “creme”, quando na realidade, temos a forma farmacêutica pasta, que é uma suspensão de alta concentração de sólidos dispersos. As pastas, são de fato, classificadas como sistemas incoerentes. Consideradas como um sistema plástico não pela existência de estruturas

formadas pelas partículas sólidas mas pela distribuição dos sólidos densamente reunidos no líquido (Voigt, 1982; Ansel 2000; Remington, 1992).

2.6 CONTROLE DE QUALIDADE DE PRODUTOS FARMACÊUTICOS

A necessidade de colocar no mercado produtos cada vez mais competitivos e inovadores requer que toda a cadeia produtiva seja realizada com excelência. O controle de qualidade visa atender todas as exigências dos órgãos regulamentadores e fiscalizadores, para que o produto acabado seja produzido com alto padrão de qualidade. O custo elevado de importação de insumos farmacêuticos ativos (IFAs) obrigou o mercado brasileiro de medicamentos a produzir padrões primários para a indústria farmacêutica brasileira. Para tal, surgiu a necessidade de manter laboratórios com potencial para o desenvolvimento de análises de controle de qualidade. Atualmente a Farmacopéia Brasileira disponibiliza inúmeros padrões primários, o que facilita o controle de qualidade nas indústrias de pequeno e médio porte.

Um grande passo para a excelência na qualidade dos produtos farmacêuticos nacionais foi à presença marcante de empresas multinacionais da área farmacêutica instaladas no Brasil que provocaram, em grande parte, a disseminação das Boas Práticas de Fabricação, a partir da década de 1970. A Portaria nº14 da Secretaria de Vigilância Sanitária, em 1981, estabeleceu inspeções para avaliar o atendimento às Boas Práticas no Brasil. Essa Portaria foi revista e instalou-se um programa efetivo de inspeções à industria farmacêutica disposto na Portaria nº 16, de 06 de março de 1995 que provocou impacto positivo na busca da qualidade dos produtos farmacêuticos. Esta portaria foi revogada pela Resolução da Diretoria Colegiada RDC nº 134 de 13 de julho de 2001 da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), com teor e impacto ainda mais positivos. Determina a todos os estabelecimentos fabricantes de medicamentos, o cumprimento das diretrizes estabelecidas no Regulamento Técnico das Boas Práticas para a Fabricação de Medicamentos, conforme o anexo I da Resolução abrangendo garantia da qualidade, boas práticas de fabricação, controle de qualidade, sanitização e higiene, validação, reclamações, recolhimento de produtos, etc. Atualmente, o cumprimento das diretrizes estabelecidas no Regulamento Técnico de Boas Práticas de Fabricação de Medicamentos é determinado pela Resolução RDC 17 de 16 de abril de 2010 da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (Brasil, 1981; Brasil, 2010; Pinto, et al, 2003; Brasil, 2001; Brasil, 1995).

O setor de controle de qualidade exerce atividades específicas inerentes a comprovação da qualidade nos insumos adquiridos ou produtos elaborados a partir dos mesmos, para tanto é necessário desenvolver algumas atividades específicas como: a) avaliar as condições de transporte e armazenamento dos insumos recebidos, por ocasião da amostragem; b) aprovar ou rejeitar matérias-primas, material de embalagem, rótulos, produtos semi-elaborados e lotes de produtos terminados, de acordo com as normas próprias do controle de qualidade; c) amostrar todos os insumos, seguindo as instruções específicas, a fim de não alterar a integridade dos mesmos, seja por contaminação cruzada ou agentes microbianos; d) executar análises em amostrar, sejam por teste físicos, químicos ou biológicos; e) rever e revisar registros de produção, para assegurar que não foram cometidos enganos, e se foram, que as providências corretivas tenha sido tomadas assim como as causas investigadas e sanadas; f) acompanhar cada processo de produção para certificar-se de que os métodos de produção preconizados estão sendo seguidos e verificar se as especificações de qualidade estão sendo seguidas; g) elaborar métodos de controle de qualidade adequados a finalidade bem como especificações a serem seguidas no ciclo de produção, que garantam qualidade; h)emitir boletins analíticos; i) avaliar as condições ambientais da área produtiva, seja antes ou durante a manipulação dos produtos; j) avaliar e calibrar equipamentos analíticos e ou de produção; k) estudar novas técnicas analíticas com adaptação dos métodos para os produtos da empresa; l) elaborar os planos de estudo de estabilidade em produtos novos; m) dar suporte técnico aos demais setores e; n) participar de estudos de validação de processo. Para que estas atividades sejam exercidas com êxito a Unidade de Controle de Qualidade deverá contar com pessoal, recursos e instalações adequados à sua finalidade (Pinto, et al, 2003).

2.7 CONTROLE NA PRODUÇÃO DE MEDICAMENTOS

O controle de qualidade é um processo pelo qual a indústria avalia a qualidade real, compara padrões e toma decisões conforme os resultados. Procedimentos escritos indicando recebimento, identificação, armazenamento, manipulação, testes e aprovação ou rejeição de todos os componentes da formulação, materiais de embalagens e tampas, devem ser conservados e seguidos. Substâncias químicas, recipientes, tampas devem apresentar especificações química e física estabelecidas pelo fornecedor no momento da compra. Quando materiais de embalagem e matérias-primas são rejeitados devem ser identificados e controlados para evitar seu uso durante a produção (Ansel, et al, 2007).

A qualidade para medicamentos é um atributo de caráter não apenas comercial, mas também legal, ético e moral. Assim, enquanto a qualidade para muitos produtos é uma questão de competitividade, no campo de saúde deve ser obrigatoriamente atendida e o não cumprimento de especificações de qualidade consideradas imprescindíveis pode ter sérias complicações (Gil, 2007).

As metodologias a serem aplicadas no Controle de Qualidade de Medicamentos quanto aos aspectos físicos, físico-químicos e microbiológicos estão contempladas nas monografias oficiais de formas farmacêuticas e metodologias gerais, inscritas na Farmacopéia Brasileira ou nos compêndios internacionais. A saber, Farmacopéia Americana e seu Formulário Nacional, Farmacopéia Européia, Farmacopéia Britânica, Farmacopéia Francesa e Farmacopéia Internacional.

Os métodos químicos são os métodos resultantes de um processo de transformação química, descritos pela maioria das farmacopéias oficiais, por serem os mais acessíveis e de menor custo. Classificam-se em gravimétrico, volumétrico e gasométrico. Os métodos químicos de identificação de funções ou determinados grupos químicos presentes em fármacos, consistem em reações que resultam em formação de precipitado, produto colorido, desprendimento de gás, descoramento do regente usado ou outro fenômeno qualquer, facilmente perceptível. Além destes, os métodos físicos, que são aqueles descritos pela ciência básica. Classificam-se em mecânicos (medição de energia e força); térmicos (medição de temperatura); ópticos, medição de energia radiante (absorção, transformação e emissão); elétricos (medição de fenômenos eletroquímicos); radioquímicos (medição de radioatividade). E finalmente, os métodos biológicos que são aqueles utilizados para medir a potencial terapêutico de um medicamento (grau de inibição de um agente microbiano), também são utilizados para contagem de agentes patógenos de uma determinada amostra ou matéria-prima que utiliza reagentes biológicos, tais como microorganismos, animais, fluidos e órgãos isolados de animais. A característica dos reagentes biológicos é a sua variabilidade. Para que possamos estudá-los é necessário o emprego de padrões de referência adequados e métodos estatísticos dos experimentos, bem como uma criteriosa análise de resultados (Brandão, 2001).

Durante o processo de produção dos lotes, amostras devem ser coletadas para fins de controle de qualidade. Os controles de processo são classificados em a) aqueles realizados pelo pessoal da produção, no momento da operação, para assegurar que os equipamentos conduzam à obtenção de produtos com características dentro dos limites estabelecidos e, b) aqueles realizados pelo pessoal do laboratório de controle de qualidade para assegurar a

concordância com todas as especificações do produto e uniformidade em cada lote. Os registros de produção, controle e distribuição devem ser conservados por no mínimo 1 (um) ano após o término do prazo de validade do lote do produto. Estes devem incluir os registros de limpeza e manutenção dos equipamentos, especificações e números dos lotes componentes da formulação (Ansel, et al, 2007).

Normas de Qualidade e Boas Práticas de Fabricação (BPF)

O setor farmacêutico, como já vimos, é um setor regulado por leis próprias, e no que diz respeito a padrões de qualidade apresenta exigências bastante rígidas, já que seus produtos e práticas afetam a segurança do consumidor. Os padrões de qualidade seguidos pelos fabricantes podem seguir normas pertencentes a duas categorias a) as obrigatórias e as voluntárias, cabendo a este estabelecer sua própria política de qualidade.

No Brasil, o órgão responsável por fiscalizar o setor farmacêutico é a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), criada em 19 de abril de 1999, pelo Ministério da Saúde (MS). O modelo adotado segue os padrões de agências européias e dos Estados Unidos. Com a finalidade de estabelecer uma referência para inspeção das instalações, processos e produtos, bem como fornecer treinamento a seus inspetores, a ANVISA publica regulamentos técnicos voltados ao setor farmacêutico. Atualmente a Resolução do Colegiado RDC 210/2003, revogada pela RDC 17/2010 dita os requisitos mínimos necessários que devem possuir as indústrias para garantir a qualidade de medicamentos que fabricam (Brasil. 2003; Brasil, 2010).

O conjunto de normas obrigatórias, descritas pelas Boas Práticas de Fabricação para medicamentos e produtos afins surgiu nos EUA, em 1902, e serviram de base para as normas adotadas por quase todos os países. Em 1948, a Organização Mundial de Saúde (OMS), vinculada à Organizações das Nações Unidas (ONU), criou um conjunto de normas para boas práticas de fabricação, que é adotada pelo Mercado Comum do Sul (MERCOSUL). Essas normas foram revisadas em 1990 com base nas normas da série ISO 9000, tornando-se mais abrangentes no que diz respeito à garantia de qualidade. As normas da série ISO complementam as obrigatórias das BPFs, de modo que sua certificação dá ao fabricante posição de *status* (Gil, 2007; Who, 2003).

Sistema ISO 9000

A International Organization for Standardization (ISO) é um organismo mudial de normatização que entrou em funcionamento em 1947. Atualmente conta com a participação de 53 países e o Brasil é um dos seus fundadores, tendo como seu representante a Associação Brasileira de Normas Técnicas (ABNT). Sua principal atividade é a elaboração de normas técnicas que visam não apenas auxiliar os fabricantes no estabelecimento e gerenciamento de padrões técnicos, avaliação de conformidade, soluções de problemas de produção e de distribuição, como também servem como norteadoras para o estabelecimento de regulamentações por parte dos governos e lideranças econômicas, além de contribuir para que o consumidor possa estar adquirindo produtos e serviços de origem confiável (Gil, 2007).

2.8 VALIDAÇÃO DE MÉTODOS ANALÍTICOS

A validação de métodos analíticos é um processo pelo qual estudos estatísticos são utilizados para garantir que o método em questão atenda às exigências desejadas, fornecendo uma evidência documentada de que o método realiza aquilo para o qual é indicado a fazer. Os critérios empregados na validação de métodos analíticos são complexos e dependem fundamentalmente do objetivo analítico do ensaio (Gil, 2007).

Um método analítico deve, idealmente, ser exato para fornecer valor real, ser preciso para fornecer em um menor número de ensaios esse valor real, ser seletivo para que a exatidão não desvie com interferentes potenciais, ser sensível ou capaz de determinar as menores concentrações possíveis e, enfim, responder de uma forma proporcionalmente linear, ao longo da ampla faixa de concentração.

2.9 ESTUDO DE ESTABILIDADE

A estabilidade de produtos farmacêuticos depende de fatores ambientais como temperatura, umidade e luz, e de outros relacionados ao próprio produto como propriedades físicas e químicas de substâncias ativas e excipientes farmacêuticos, forma farmacêutica e sua composição, processo de fabricação, tipo e propriedades dos materiais de embalagem. O estudo de estabilidade acelerada é projetado para acelerar a degradação química e/ou mudanças físicas de um produto farmacêutico em condições forçadas de armazenamento. Os dados assim obtidos, juntamente com aqueles derivados dos estudos de longa duração, podem

ser usados para avaliar efeitos químicos e físicos prolongados em condições não aceleradas e para avaliar o impacto de curtas exposições a condições fora daquelas estabelecidas no rótulo do produto, que podem ocorrer durante o transporte (Brasil, 2005).

Primeiramente são avaliadas as características organolépticas, o valor do pH e da viscosidade das formulações. Estes parâmetros são estudados comparativamente, considerando-se as características iniciais do produto e suas alterações ao longo do tempo (Baby, 2005). Esses estudos geram resultados que são avaliados comparativamente exigindo que os ensaios sejam conduzidos em paralelo com um produto de referência (Brasil, 2005).

Fatores extrínsecos e intrínsecos podem influenciar na estabilidade das formulações. Aqueles que envolvem condições externas às quais os produtos ficam expostos e aqueles que estão relacionados com a natureza da formulação e a interação dos seus componentes, respectivamente (Velasco-de-Paola, 2001).

3 OBJETIVOS

3 OBJETIVOS

Desenvolver estudo galênico de formas farmacêuticas para uso odontológico.

3.1 OBJETIVO GERAL

Desenvolver formas farmacêuticas para uso odontológico (dentifrício e enxaguatório bucal) que sirvam de veículo para incorporação do extrato bruto seco das folhas de *Eugenia uniflora* L. e determinar a Concentração Inibitória Mínima deste extrato.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Realizar estudo galênico de formas farmacêuticas (dentifrício e enxaguatório bucal) compatíveis com o extrato bruto seco das folhas de *Eugenia uniflora* L.
- Realizar estudos de estabilidade preliminar e acelerada do produto acabado.
- Realizar estudo microbiológico para determinação de Concentração Inibitória Mínima (CIM) do extrato bruto seco das folhas de *Eugenia uniflora* L.

.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4 MATERIAL E MÉTODOS

Os estudos que compõem este trabalho são estudos preliminares de controle de qualidade da matéria-prima, estudos microbiológicos, estudos galênicos e estudos de estabilidade preliminar e acelerada.

4.1 ESTUDOS FITOQUÍMICOS

4.1.1 Prospecção dos constituintes químicos do EBS de *E. uniflora* L.

A prospecção dos constituintes químicos no extrato seco das folhas de *E. uniflora* L. foi feita a partir da ressuspensão em água, para a verificação da presença das classes de substâncias químicas desejáveis.

A realização dos testes qualitativos para constituintes químicos, fenóis e taninos, do EBS de pitanga (*Eugenia uniflora* L.) foi realizado com o fim de aprovar o material obtido do ponto de vista da presença destes ativos pretendidos na amostra estudada, para garantir o sucesso dos estudos posteriores considerando que a presença de taninos e outros compostos fenólicos tem sido descrita na literatura como principais constituintes e sendo ainda, atribuídos a estes, alguma atividade farmacológica.

4.1.2 Obtenção do EBS das folhas de *E. uniflora* L.

O material botânico foi coletado de um indivíduo adulto cultivado em uma propriedade particular localizada no município de Bezerros-PE. No momento da coleta, o indivíduo adulto que apresentava floração, ausência de contaminantes, praguicidas e pragas, aproximadamento 1,5 metros de altura e no momento da coleta as condições ambientais eram temperatura de 21ºC ± 2ºC e a umidade relativa do ar de 38%. Em seguida, foi colocado em estufa a 33ºC durante uma semana para eliminação da umidade e estabilização do conteúdo enzimático, sendo posteriormente triturado a pó. O pó obtido foi utilizado para extração por maceração em solução hidroalcoólica a 70%. Para obtenção do extrato bruto seco (EBS) o extrato fluido obtido após maceração foi submetido a evaporação em banho-maria a 60 ºC e obteve-se um extrato pilular que foi então levado ao dessecador com sílica gel e vácuo até secura total.

4.1.3 Teste qualitativo para fenóis e taninos

No teste qualitativo para fenóis e taninos adicionou-se três gotas de solução alcoólica de $FeCl_3$ a uma alíquota de 2 mL da amostra. Qualquer variação de coloração em comparação ao branco será indicativa de presença de fenóis. A presença de precipitado escuro de tonalidade azul escuro indicará a presença de taninos pirogálicos (taninos hidrolizáveis) e verde oliva, a presença de taninos catéquicos (taninos condensados). A coloração verde acinzentado indica a mistura destes dois taninos.

4.1.4 Prospecção da determinação de cinzas totais da matéria-prima

A determinação de cinzas totais foi realizada a partir das folhas de *E. uniflora* L. com o fim de garantir a pureza da amostra, sendo as cinzas um parâmetro de avaliação da presença de material inorgânico na amostra. Não aplica-se aqui o estudo de resíduo seco para avaliação do teor de solutos no extrato pois esta análise não está indicada no caso da pitanga devido a quantidade de óleos essenciais que seriam perdidos na análise.

4.1.5 Determinação de cinzas totais

Foi realizado o método indicado na monografia, preconizado pela Farmacopéia Brasileira 4ª edição, (1988), que avalia o teor de cinzas pela calcinação em mufla e determina o limite máximo de 12% de cinzas.

4.1.6 Prospecção da determinação de água da matéria-prima

A determinação de água foi realizada com objetivo de garantir a qualidade da amostra quanto à quantidade de água presente no material sujeito ao estudo.

4.1.7 Determinação de água em drogas vegetais

Foi realizado o método indicado na monografia, preconizado pela Farmacopéia Brasileira 4ª edição, (1988), para determinação de água em drogas vegetais. A monografia define o limite máximo de até 13% de água na amostra.

4.2 ESTUDOS MICROBIOLÓGICOS

4.2.1 Preparação do inóculo

Os inóculos foram obtidos a partir de culturas recentes dos microrganismos *Streptococcus sanguis* (ATCC 15300), *Staphylococcus aureus* (ATCC 6538), *Candida albicans* (ATCC 10321), preparando-se suspensões padronizadas pela turvação de 0,5 da escala de MacFarland em solução salina fisiológica.

4.2.2 Determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM) do EBS das folhas de *E. uniflora* L.

A Concentração Inibitória Mínima (CIM) foi determinada pela técnica de poços por difusão em ágar. Para isso foram feitas perfurações de aproximadamente 6 mm de diâmetro nas placas com meio de cultura (Ágar Mueller Hinton e Ágar Sabouraud) onde anteriormente foram semeadas as suspensões dos microrganismos teste.

O EBS de *E. uniflora* L. foi diluído nas proporções 1:1, 1:2, 1:4, 1:8, 1:16, 1:32, 1:64, obtendo-se concentrações entre 50 e 0,39 mg/mL. Nos poços foram adicionados 50 µL das diluições do extrato e em seguida as placas incubadas em estufa bacteriológica a 37ºC ± 2ºC por 18h para as bactérias e por 36h para a levedura. A clorexidina 0,12% foi utilizada para realização dos estudos comparativos, os ensaios foram realizados em duplicata. O resultado foi avaliado, considerando-se a menor concentração onde ocorreu inibição do crescimento microbiano com formação do halo de inibição, por medição com paquímetro.

4.3 ESTUDOS GALÊNICOS

4.3.1 Prospecção do desenvolvimento do dentifrício contendo EBS das folhas de *E. uniflora* L.

O dentifrício tem três funções básicas: deve contribuir com a escovação e eliminar a placa, deve conter substâncias protetoras específicas, principalmente Flúor e deve estimular o desejo de limpeza através do seu sabor (Panzeri, 1983; Charlet, 1996). Foi desenvolvido um dentifrício com consistência ideal após obtenção de várias fórmulas estudadas e testadas. A matéria-prima em estudo foi incorporada a melhor base obtida.

4.3.2 Técnica preparatória do dentifrício contendo EBS das folhas de *E. uniflora* L.

Pesou-se o natrosol e foi adicionado a água, levando-se ao aquecimento a 50ºC até obtenção de uma rede polimérica. Pesou-se os demais constituintes da fase 1 e adicionou-se ao gel, misturou-se vigorosamente por 20 minutos. Pesou-se a fase 2 e misturou-se a fase anterior até total solubilização. Pesou-se a fase 3 e verteu-se sobre a mistura anterior, homogeneizando. Deixou-se em repouso por 24h. Após este período, adicionou-se o EBS de *E. uniflora* L. e agitou-se até atingir consistência de um creme macio e brilhante de coloração esverdeada. Envasou-se logo após a obtenção para evitar o ressecamento da formulação.

4.3.3 Prospecção do desenvolvimento do enxaguatório bucal contendo EBS das folhas de *E. uniflora* L.

Para o enxaguatório bucal, a principal característica esperada foi a possibilidade de adesão ao produto por características como aroma suave e agradável associado à atividade antimicrobiana do EBS de *E. uniflora* L.

4.3.4 Técnica preparatória do enxaguatório bucal contendo EBS das folhas de *E. uniflora* L.

Em um gral, triturou-se o nipagin e a sacarina sódica. Adicionou-se o álcool absoluto e solubilizou-se até obtenção de uma mistura homogênea. Adicionou-se o sorbitol 70%, homogeneizou-se. Esse processo foi repetido para todos os componentes líquidos da fórmula. Após a obtenção da solução base para o enxaguatório bucal, solubilizou-se o EBS de pitanga em água destilada suficiente. Adicionou-se aos poucos o EBS solubilizado a solução base obtida anteriormente, homogeneizando sempre. Adicionou-se o aroma. Ao fim, adicionou-se água destilada em quantidade suficiente para completar o volume percentual (q.s.p. 100).

4.4 CONTROLE DE QUALIDADE DO PRODUTO ACABADO

4.4.1 Prospecção para estudo de estabilidade preliminar e acelerada das formas farmacêuticas para uso odontológico contendo o EBS das folhas de *E.uniflora* L.

As características do produto acabado e o comportamento das formulações em condições que simulem as condições de transporte e prateleira foram avaliadas para garantir a

qualidade do produto. Esses parâmetros serão importantes para o futuro da pesquisa, sendo a base para o início dos estudos de estabilidade de longa duração.

Foram utilizadas amostras das formulações desenvolvidas, enxaguatório e dentifrício, suficientes para realização dos testes em triplicata. Através do guia de estabilidade de produtos cosméticos (Brasil, 2005) foram realizados estudos de estabilidade preliminar e acelerada, onde os produtos previamente formulados foram submetidos a condições de estresse, tendo como objetivo observar as propriedades organolépticas (aspecto, cor e odor) e fisico-químicas (pH, densidade e centrifugação) das formulações permaneceriam estáveis.

4.4.2 Estudo de Estabilidade Preliminar

No estudo de estabilidade preliminar as amostras analisadas foram armazenadas em condições de temperatura ambiente (20 – 25ºC); geladeira (2-5ºC) e estufa (40ºC) sendo avaliadas em intervalos de 48h durante 12 dias (6 ciclos).

4.4.3 Estudo de Estabilidade Acelerada

No estudo de estabilidade acelerada as formulações foram submetidas as mesmas condições de temperatura do estudo anterior, as quais foram avaliadas nos tempos: zero, 24 horas, 7º, 15º, 30º, 60º e 90º dias.

4.4.4 Propriedades Organolépticas

Foram avaliados os parâmetros aspecto, cor e odor na avaliação das propriedades organolépticas do enxaguatório bucal. Quanto ao dentifrício, foram avaliados aspecto e cor. Nas avaliações do aspecto dos produtos, as alterações foram classificadas como (I) normal, sem alteração; (II) levemente separado, levemente precipitado ou levemente turvo e (III) separado, precipitado ou turvo. As alterações de cor e odor, os critérios foram os seguintes: (I) normal, sem alteração; (II) levemente modificada; (III) modificada e (IV) intensamente modificada.

4.4.5 Propriedades físico-químicas

Os critérios observados quanto as propriedades físico-químicas do enxaguatório bucal e dentifrício foram, pH, densidade e aspecto visual após centrifugação. Nas avaliações do aspecto dos produtos após o processo de centrifugação as amostras foram classificados como (I) sem separação de fases; (II) leve separação de fases; (III) notável separação de fases; (IV) produto com 50% de separação e (V) produto com mais de 50% de separação (Brasil, 2004).

4.4.6 pH

O pH foi determinado por meio da técnica potenciométrica com o equipamento SCHOTT Fieldlab para o enxaguatório bucal, onde o pHmetro foi calibrado na faixa de pH de 4,0 e 10,0 e para o dentifrício foi utilizada a técnica com papel de tornassol de pH 0,0 a 14,0, sendo todas as análises das amostras realizadas em triplicata e de acordo com os intervalos de tempo citados anteriormente nos itens 4.4.2 e 4.4.3.

4.4.7 Densidade

A análise da densidade das duas formulações consistiu na medição através do método de proveta graduada, onde mediu-se a massa dela vazia na balança analítica e foi obtido m_1. Em seguida, foi adicionado 10mL de cada produto a proveta e foi obtida uma segunda massa igual a m_2. Após este processo fez-se a diferença entre m_1 e m_2 resultando em m_f. Logo após dividiu-se m_f pelo volume indicado na proveta (10mL) e dessa forma encontrou-se a densidade dos produtos. Este processo foi repetido de acordo com os intervalos especificados nos ites 4.4.2 e 4.4.3. A densidade foi obtida utilizando-se as seguintes equações:

$$m_2 - m_1 = m_f$$

$$d = m_f / v$$

4.4.8 Ciclo gelo-degelo e centrífuga combinados

No estudo de estabilidade preliminar as amostras foram submetidas ao estresse em estufa a 40°C, na geladeira com a temperatura na faixa de 2°C a 5°C e uma das amostras permaneceram na temperatura ambiente. Este estudo levou um período de 12 dias para cada

produto, onde a cada 24 horas cada produto era transferido para uma condição de temperatura diferente (geladeira ou estufa) e a cada 48 horas eram realizados os testes organolépticos e físico-químicos previamente descritos.

No estudo de estabilidade acelerada cada amostra de cada produto permaneceu em uma condição diferente de temperatura por um período de 90 dias, contudo foram realizadas as análises organolépticas e físico-químicas no tempo 0, 24 horas, 7°, 15°, 30°, 60° e 90° dias.

Ao final de cada análise realizada, foram retiradas alíquotas de cada amostra e submetidas a ação de centrífuga a 3000 rpm durante 30 minutos e classificadas de acordo com os critérios citados no item 4.4.5.

4.4.9 Viscosidade

Foi analisada a viscosidade das amostras de dentifrício, em triplicata, utilizando-se o viscosímetro de Brookfield de 4 velocidades. As amostras foram analisadas nas velocidades de 6, 12, 30 e 60 rpm com o spindle de número 4.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

O estudo da presença de taninos e outros compostos fenólicos foi realizado com o fim de confirmar a presença deste constituintes na matéria-prima em estudo, visto que, a literatura já descreveu estes compostos no gênero *Eugenia*. O resultado mostrou que, como já esperado, haja vista informações obtidas no trabalho de Oliveira e colaboradores (2006), a nossa amostra possívelmente apresenta em sua composição taninos e outros compostos fenólicos, o que nos faz considerar que o método extrativo foi válido e nosso material em estudo esta aprovado neste parâmetro de qualidade.

A determinação de cinzas totais é um parâmetro importante considerando que através dele é possível identificar se existe a presença de compostos inorgânicos na amostra. Em certos vegetais é possível detectar cinzas relacionadas à presença de minerais como Ca, Fe, Na, Mn, Cu, S, Co, entre outros, que podem estar relacionados com a nutrição do vegetal. Altos níveis de cinzas podem ser indicativos da presença de contaminantes como areia e sujeira. Baseado no resultado, onde a amostra submetida ao estudo apresentou 1% de cinzas, e na monografia do vegetal, a amostra foi aprovada diante deste parâmetro de qualidade.

O material em estudo foi submetido à secagem após a coleta para prevenir a proliferação de microrganismos na amostra devido à presença de água livre. Para confirmação de que o material está atendendo a especificação descrita na monografia (limite de água de 13%), uma amostra foi submetida à determinação de água em drogas vegetais. O resultado ao final da análise, 8,7% de água, nos deu condições para aprovar a matéria-prima em estudo neste parâmetro de pureza para ser dada continuidade ao estudo.

Os resultados obtidos no teste de Concentração Inibitória Mínima (CIM) do extrato bruto seco da *Eugenia uniflora* L. sobre os microrganismos (*Streptococcus sanguis*, *Staphylococcus aureus* e *Cândida albicans*) estão expostos na tabela 01.

Tabela 01 - Concentração Inibitória Mínima em meio sólido do extrato de *Eugenia uniflora* L., sobre *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus sanguis* e *Cândida albicans*.

	Concentração do extrato bruto seco (mg/mL)							
	50	25	12,5	6,25	3,12	1,56	0,78	0,39
Linhagens bacterianas	**Diâmetro dos halos de inibição (mm)**							
Staphylococcus aureus	22	19	16	13	12	0	0	0
Streptococcus sanguis	24	21	19	15	12	11	0	0
Cândida albicans	19	17	16	14	0	0	0	0

Figura 02 - Atividade antimicrobiana do extrato bruto seco das folhas de *Eugenia uniflora L.* sobre *S. sanguis*, nas concentrações de 50mg/mL (1); 25mg/mL (2); 12,5 mg/mL (3); 6,25 mg/mL (4); 3,12 mg/mL (5); 1,56 mg/mL (6); 0,78mg/mL (7); 0,39mg/mL (8).

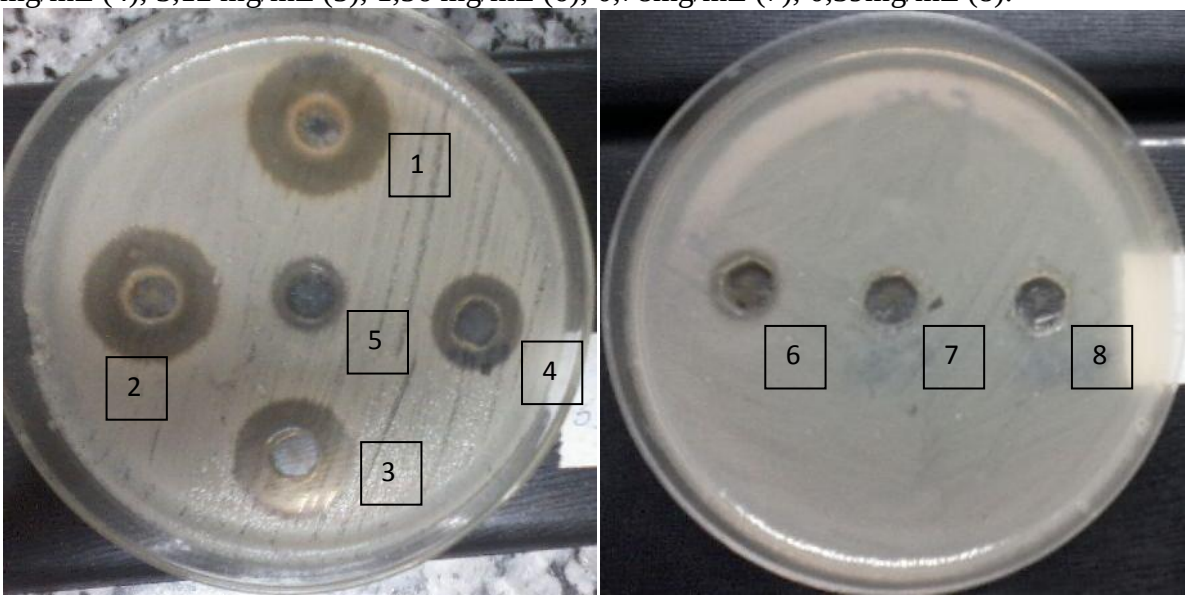


Figura 03 - Atividade antimicrobiana do extrato bruto seco das folhas de *Eugenia uniflora L.* sobre *S. aureus*, nas concentrações de 50mg/mL (1); 25mg/mL (2); 12,5 mg/mL (3); 6,25 mg/mL (4); 3,12 mg/mL (5); 1,56 mg/mL (6); 0,78mg/mL (7); 0,39mg/mL (8).

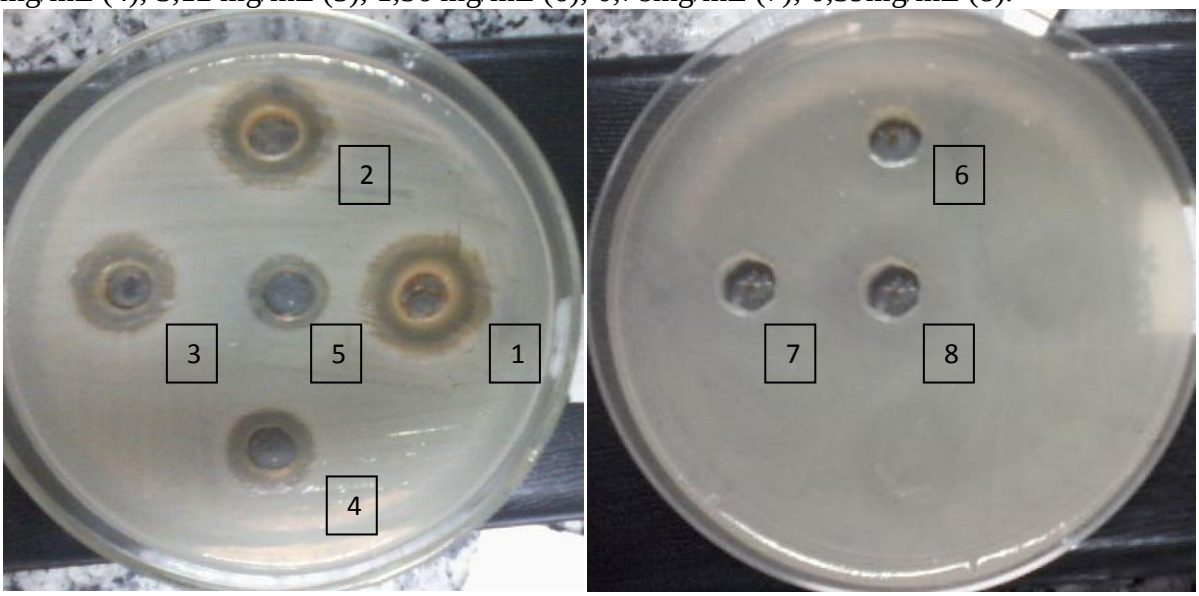
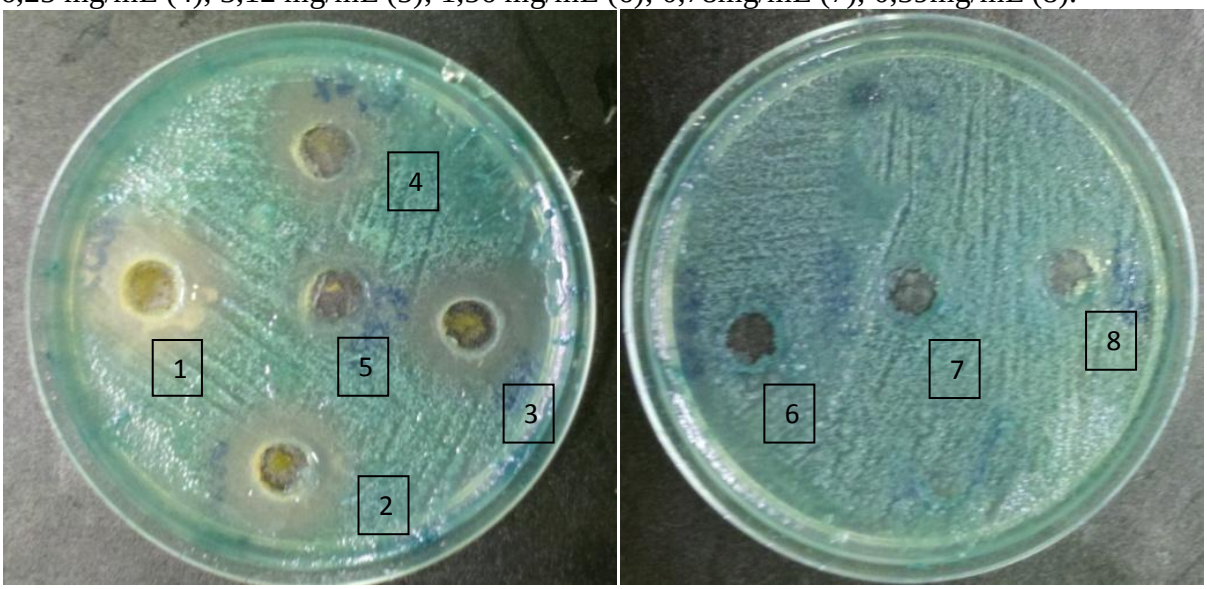


Figura 04 - Atividade antimicrobiana do extrato bruto seco das folhas de *Eugenia uniflora L.* sobre *Candida albicans*, nas concentrações de 50 mg/mL (1); 25mg/mL (2); 12,5 mg/mL (3); 6,25 mg/mL (4); 3,12 mg/mL (5); 1,56 mg/mL (6); 0,78mg/mL (7); 0,39mg/mL (8).



No teste de Concentração Mínima Inibitória (CIM), todos os microrganismos testados foram sensíveis ao extrato bruto seco da *Eugenia uniflora* Linn. A CIM sobre o *Streptococcus sanguis* foi de 1,56 mg/mL com halo de 11 mm (Tabela 04 e Figura 02). Resultados semelhantes foram encontrados onde o infuso das folhas frescas da *Eugenia uniflora* L. apresentou CIM de 1,56 mg/mL

O extrato bruto seco (EBS) deste estudo apresentou halo de inibição de 12 mm numa concentração de 3,12 mg/mL frente a *Staphylococcus aureus* (Figura 03). Segundo Victória e colaboradores (2012), o óleo essencial de *Eugenia uniflora* L. (EUL) apresentou atividade antibacteriana frente a esse microrganismo demonstrando um halo de inibição de 26 ± 7 mm (disco de papel 6 mm) e um CIM = 0,8 mg/mL. Podemos observar que, o EBS também se mostrou efetivo frente aos microrganismos cariogênicos descritos.

O gluconato de clorexidina foi utilizado como controle positivo neste estudo e apresentou inibição do crescimento dos microrganismos até a última diluição (0, 0009 %) (Tabela 02 e Figuras 05, 06 e 07).

Tabela 02 - Concentração Inibitória Mínima em meio sólido do gluconato de clorexidina a 0,12% sobre *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus sanguis* e *Cândida albicans*.

	Concentração do gluconato de clorexidina a 0,12% (%)							
	0,12	0,06	0,03	0,015	0,0075	0,0038	0,0019	0,0009
Linhagens bacterianas	**Diâmetro dos halos de inibição (mm)**							
Staphylococcus. aureus	23	22	19	18	16	15	14	13
Streptococcus. sanguis	23	21	20	20	17	14	13	10
Cândida albicans	24	22	21	21	14	13	12	10

Figura 05 - Controle positivo do gluconato de clorexidina a 0,12% sobre *S. sanguis*, nas concentrações de 0,12% (1); 0,06% (2); 0,03% (3); 0,015% (4); 0,0075%(5); 0,0038(6); 0,0019(7); 0,0009(8).

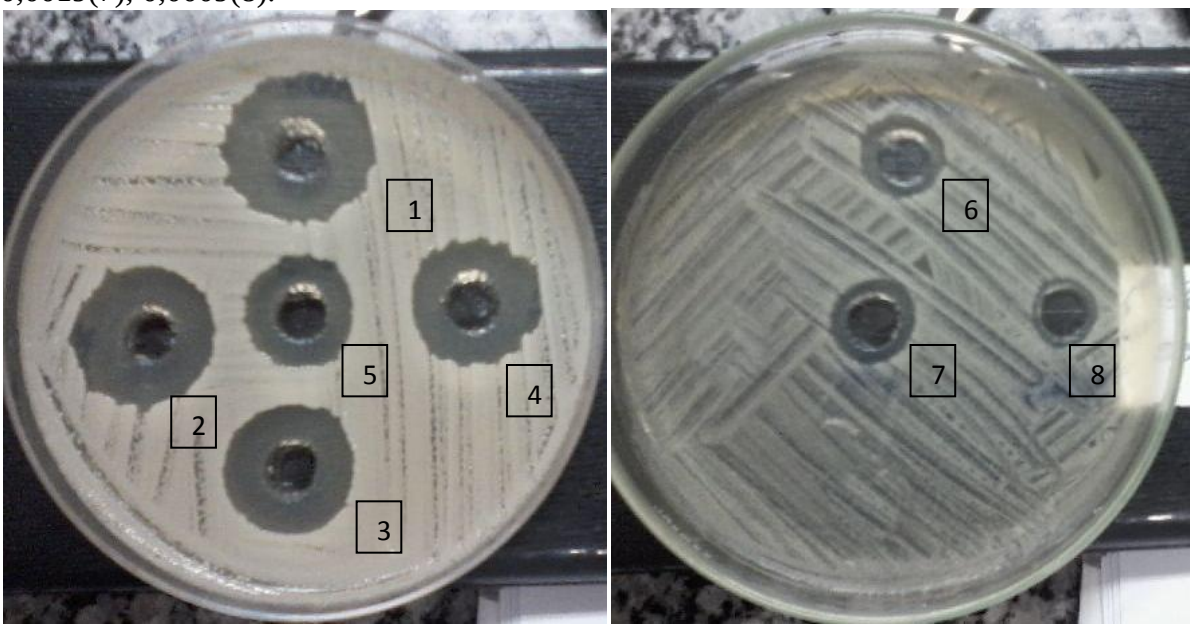


Figura 06 - Controle positivo do gluconato de clorexidina a 0,12% sobre *S. aureus*, nas concentrações de 0,12% (1); 0,06% (2); 0,03% (3); 0,015% (4); 0,0075%(5); 0,0038 (6); 0,0019 (7); 0,0009 (8).

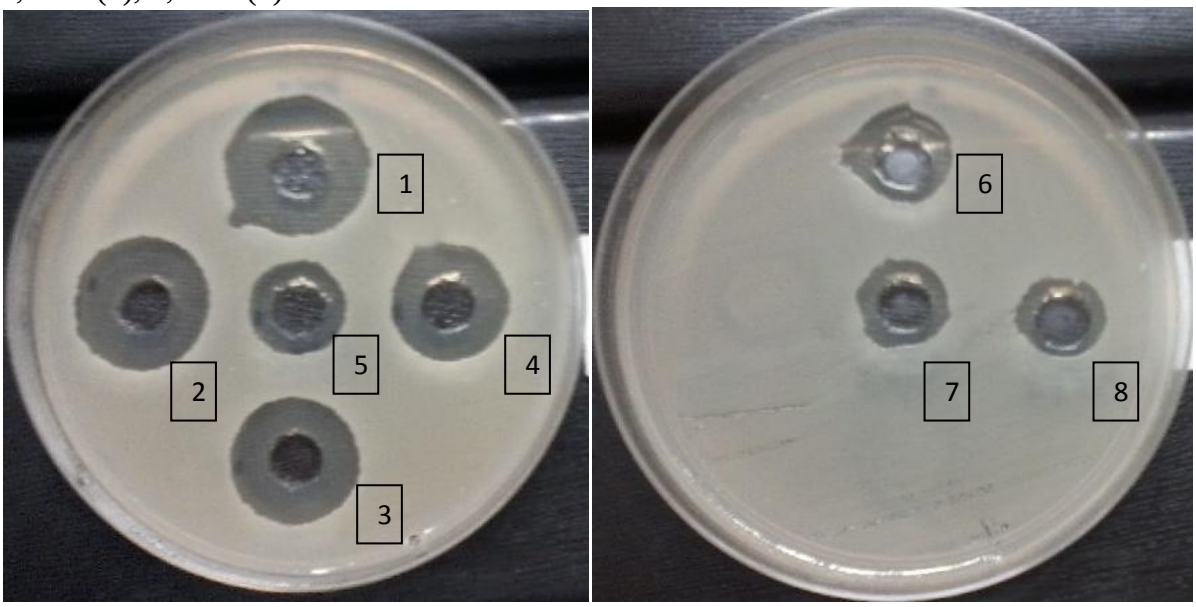
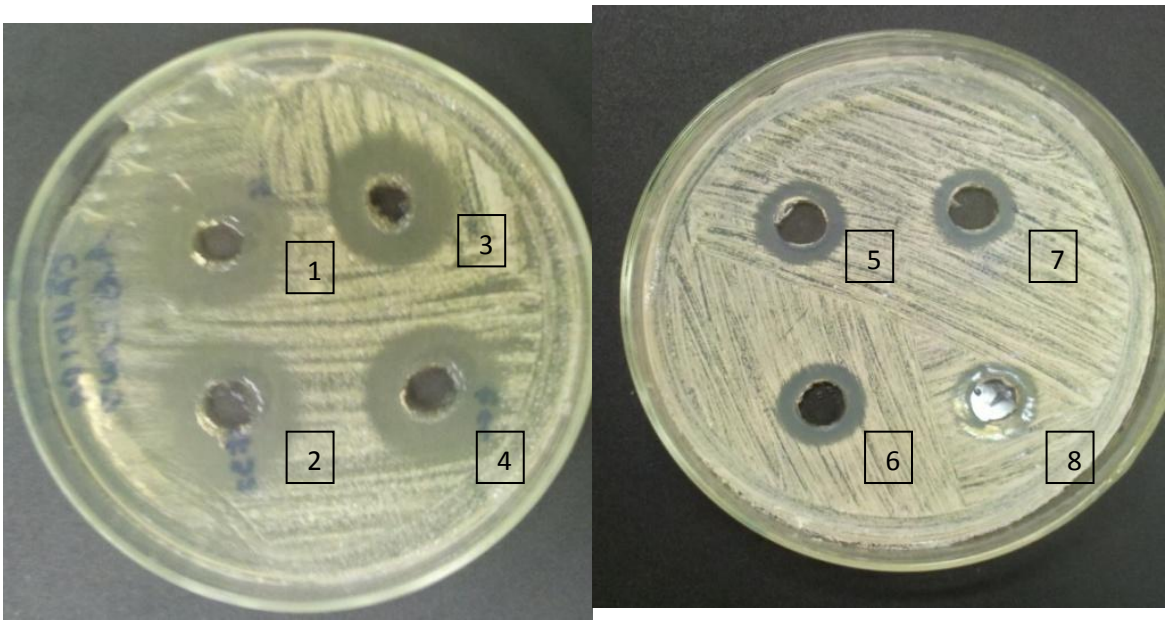


Figura 07 - Controle positivo do gluconato de clorexidina a 0,12% sobre *Candida albicans*, nas concentrações de 0,12% (1); 0,06% (2); 0,03% (3); 0,015% (4); 0,0075%(5); 0,0038 (6); 0,0019 (7); 0,0009 (8).



Atualmente, dentre os agentes químicos utilizados no combate das afecções bucais, destaca-se o gluconato de clorexidina, que tem sido indicado pela sua eficácia comprovada na remoção química do biofilme cariogênico ou periodontopatogênico (Jovito, et al, 2009). A clorexidina é um bisbiguanídio catiônico de amplo espectro antimicrobiano, que tem ação contra bactérias Gram-positivas, Gram-negativas e fungos (Borba, et al, 2008). Porém, o uso

prolongado desse antisséptico pode trazer efeitos colaterais como, por exemplos, manchamento de dentes, restaurações, próteses e língua, disgeusia e descamação da mucosa bucal (Marinho, et al, 2003). A clorexidina foi utilizada neste estudo como controle positivo e os resultados quanto a eficácia do extrato podem ser considerados relevantes haja vista a formação de halos com diâmetros equivalentes como podemos vislumbrar nas tabelas 01 e 02. Esses resultados são animadores considerando a possibilidade da utilização deste extrato em formulações para uso odontológico em substituição de compostos como a clorexidina.

A CIM encontrada para a *Cândida albicans* no presente estudo foi 6,25 mg/mL com halo de 14 mm, valor bastante superior ao encontrado no estudo realizado por Auricchio e colaboradores, onde a CIM foi de 0,5 mg/mL. No estudo citado, o método extrativo pode ter influenciado na quantidade de metabólitos secundários relacionados com a atividade do extrato. A atividade antifúngica do óleo essencial de EUL frente a *C. albicans* foi avaliada recentemente (Victoria, et al, 2012) e o valor encontrado foi CIM= 208,3 ± 72,1 µg/mL. Apesar de ser necessária uma maior concentração do EBS das folhas de pitanga para formação do halo, esse resultado é bastante relevante considerando que a obtenção do óleo essencial esta relacionada a um alto custo, longo prazo e baixo rendimento comparando ao método de obtenção do extrato bruto seco.

Após a incorporação do extrato bruto seco da *Eugenia uniflora* L. (1%) a base do enxaguatório bucal, o produto final (ENX 4) se apresentou na forma de líquido opaco com coloração levemente esverdeada, odor característico e aroma agradável, sem quebra da forma farmacêutica. O dentifrício (CRD 7) apresentou-se na forma de gel-creme de consistência alta, macio, coloração esverdeada, odor característico e aroma agradável. As tabelas 03 e 04 apresentam as formulações obtidas.

Tabela 03 – Formulações centesimais do dentifrício à base de extrato bruto seco (EBS) de *Eugenia uniflora* L.

FORMULAÇÕES	CRD 1	CRD 2	CRD 3	CRD 4	CRD 5	CRD 6	CRD 7	CRD 8
CONSTITUINTES								
FASE 1								
NATROSOL	**0,50**	**0,50**	**1,00**	**1,00**	**1,50**	**1,50**	**2,00**	**2,00**
EDTA	**0,05**	**0,05**	**0,05**	**0,05**	**0,05**	**0,05**	**0,05**	**0,05**
PROPILENOGLICOL	**10,0**	**10,0**	**10,0**	**10,0**	**10,0**	**10,0**	**10,0**	**10,0**
METILPARABENO	**0,15**	**0,15**	**0,15**	**0,15**	**0,15**	**0,15**	**0,15**	**0,15**
PROPILPARABENO	**1,18**	**1,18**	**1,18**	**1,18**	**1,18**	**1,18**	**1,18**	**1,18**
ÁGUA	**q.s**	**q.s**	**q.s**	**q.s**	**q.s**	**q.s**	**q.s**	**q.s**
FASE 2								
GLICERINA	**10,0**	**10,0**	**10,0**	**10,0**	**10,0**	**10,0**	**10,0**	**10,0**
SACARINA	**0,15**	**0,15**	**0,30**	**0,30**	**0,40**	**0,40**	**0,50**	**0,50**
ASPARTAME	**1,00**	**1,00**	**1,00**	**1,00**	**1,00**	**1,00**	**1,00**	**1,00**
ÁGUA	**20,0**	**20,0**	**20,0**	**20,0**	**20,0**	**20,0**	**20,0**	**20,0**
CARBONATO DE CÁLCIO	**25,0**	**25,0**	**30,0**	**30,0**	**35,0**	**35,0**	**40,0**	**50,0**
FASE 3								
SORBITOL	**1,00**	**1,00**	**1,00**	**1,00**	**1,00**	**1,00**	**1,00**	**1,00**
POLISSORBATO 80	**1,00**	**1,00**	**1,00**	**1,00**	**1,00**	**1,00**	**1,00**	**1,00**
SOL. GERMAL	**0,30**	**0,30**	**0,30**	**0,30**	**0,30**	**0,30**	**0,30**	**0,30**
EBS EUL*	**0,01**	**0,01**	**0,01**	**0,01**	**0,01**	**0,01**	**0,01**	**0,01**

*EXTRATO BRUTO SECO DAS FOLHAS DE *Eugenia uniflora* L.

Tabela 04 - Formulações centesimais do enxaguatório bucal contendo EBS das folhas de *Eugenia uniflora* L.

FORMULAÇÕES	**ENX 1**	**ENX 2**	**ENX 3**	**ENX 4**	**ENX 5**	**ENX 6**
CONSTITUINTES						
ÁLCOOL ABSOLUTO	**12**	**12**	**10**	**10**	**8**	**8**
SORBITOL 70%	**10**	**10**	**10**	**10**	**10**	**10**
GLICERINA BI-DESTILADA	**10**	**10**	**10**	**10**	**10**	**10**
SACARINA SÓDICA	**0,2**	**0,2**	**0,1**	**0,1**	**0,05**	**0,05**
SALICILATO DE METILA	**0,1**	**0,1**	**0,1**	**0,1**	**0,1**	**0,1**
NIPAGIN	**0,18**	**0,18**	**0,18**	**0,18**	**0,18**	**0,18**
AROMA DE HORTELA	**1,0**	**1,0**	**0,5**	**0,5**	**0,25**	**0,25**
EBS FEUL*	**1**	**1**	**1**	**1**	**1**	**1**
AGUA DESTILADA QSP	**100**	**100**	**100**	**100**	**100**	**100**

*EXTRATO BRUTO SECO DAS FOLHAS DE *Eugenia uniflora* L.

Logo em seguida, após a incorporação do extrato bruto seco à base do enxaguatório bucal e dentifrício, foram retiradas 3 alíquotas de 60 mL cada do enxaguatório bucal e 40g cada de dentifrício para acondicionamento em erlenmeyer fechado.

No estudo da estabilidade preliminar a amostra do enxaguatório bucal que permaneceu em temperatura ambiente demonstrou aparência e odor normal até o décimo segundo dia, porém as amostras submetidas às condições de 40°C em estufa e 2°C a 5°C em geladeira apresentaram a partir do terceiro ciclo (sexto dia) odor e cor levemente modificados, apresentando aspecto levemente precipitado quando submetidos a estufa, permanecendo desta forma até o nonagésimo dia do estudo de estabilidade acelerada. No estudo de estabilidade preliminar e estudo de estabilidade acelerada, o dentifrício não apresentou alterações visíveis

em relação à cor e aspecto quando submetido às condições de temperatura na estufa, geladeira e temperatura ambiente.

Tabela 05 – Avaliação do estudo de estabilidade preliminar e acelerado do enxaguatório bucal contendo extrato bruto seco das folhas de *E. uniflora* L.

Propriedades Organolépticas			
	Aspecto	**Cor**	**Odor**
T. Ambiente	Normal, sem alteração	Normal, sem alteração	Normal, sem alteração
Geladeira	Normal, sem alteração	Levemente modificada	Levemente modificado
Estufa	Levemente precipitado	Levemente modificada	Modificado

Tabela 06 – Avaliação do estudo de estabilidade preliminar e acelerado do dentifrício contendo extrato bruto seco das folhas de *E. uniflora* L.

Propriedades Organolépticas		
	Aspecto	**Cor**
T. Ambiente	Normal, sem alteração	Normal, sem alteração
Geladeira	Normal, sem alteração	Normal, sem alteração
Estufa	Normal, sem alteração	Normal, sem alteração

O pH do enxaguatório bucal e dentifrício em temperatura ambiente no estudo da estabilidade preliminar tiveram uma média de 4,66 e 6,0 respectivamente, durante os 6 ciclos (12 dias) de análises realizadas. Em condições de ciclo gelo/degelo em que foram realizados os testes a cada 48 horas a média foi de 4,76 para o enxaguatório bucal e 6,0 para o dentifrício (Tabelas 07 e 09).

No estudo de estabilidade acelerada a média do pH no enxaguatório bucal foi de 4,66 e do dentifrício 6,0 em temperatura ambiente durante os 90 dias de teste. Na condição de temperatura em estufa a média do enxaguatório bucal foi de 4,67 e do dentifrício 6,0, sendo na geladeira 4,68 e 6,0. Após formulado, o enxaguatório bucal apresentava pH 4,61 e o dentifrício 6,0, podendo o enxaguatório bucal variar para 4,71 e o dentifrício para 7,0. Dessa forma foi possível observar que os produtos mesmo quando submetidos a condições desfavoráveis permaneceram com uma faixa de pH constante, demonstrando que trata-se de

formulações estáveis quando considerado o parâmetro físico-químico do pH (Tabelas 08 e 10).

Tabela 07 - Avaliação do pH no estudo de estabilidade preliminar do enxaguatório bucal contendo extrato bruto seco das folhas de *E. uniflora* L.

pH das amostras – Enxaguatório Bucal							
	2° dia	**4° dia**	**6° dia**	**8° dia**	**10° dia**	**12° dia**	**Média**
Temperatura ambiente	4,64	4,64	4,75	4,58	4,66	4,74	4,66
Geladeira / Estufa	4,74	4,71	4,87	4,72	4,73	4,79	4,76
Geladeira / Estufa	4,67	4,58	4,74	4,63	4,62	4,76	4,66

Tabela 08 – Avaliação do pH no estudo de estabilidade acelerada do enxaguatório bucal contendo extrato bruto seco das folhas de *E. uniflora* L.

pH das amostras – Enxaguatório Bucal							
	Tempo 0 /24 horas	**7° dia**	**15° dia**	**30° dia**	**60° dia**	**90° dia**	**Média**
Temperatura ambiente	4,74	4,70	4,70	4,62	4,62	4,60	4,66
Estufa	4,79	4,82	4,63	4,61	4,61	4,60	4,67
Geladeira	4,76	4,74	4,63	4,73	4,63	4,60	4,68

Tabela 09 – Avaliação do pH no estudo de estabilidade preliminar do dentifrício contendo extrato bruto seco das folhas de *E. uniflora* L.

pH das amostras – Dentifrício							
	2° dia	**4° dia**	**6° dia**	**8° dia**	**10° dia**	**12° dia**	**Média**
Temperatura ambiente	6,0	6,0	6,0	6,0	6,0	6,0	6,0
Geladeira / Estufa	6,0	6,0	6,0	6,0	6,0	6,0	6,0
Geladeira / Estufa	6,0	6,0	6,0	6,0	6,0	6,0	6,0

Tabela 10 – Avaliação do pH no estudo de estabilidade acelerada do dentifrício contendo extrato bruto seco das folhas de *E. uniflora* L.

pH das amostras – Dentifrício							
	Tempo 0 /24 horas	**7° dia**	**15° dia**	**30° dia**	**60° dia**	**90° dia**	**Média**
Temperatura ambiente	6,0	6,0	6,0	6,0	6,0	6,0	6,0
Estufa	6,0	6,0	6,0	6,0	6,0	6,0	6,0
Geladeira	6,0	6,0	6,0	6,0	6,0	6,0	6,0

A densidade dos produtos previamente formulados foi medida para determinar se a relação entre a massa e o volume continuou constante após os períodos de estresse na estufa, geladeira e temperatura ambiente. Dessa forma foi visto que durante o teste de estabilidade preliminar em temperatura ambiente a média da densidade medida foi do enxaguatório bucal e dentifrício foi de 1,009 g/mL e 1,219 g/mL, respectivamente. As amostras que foram transferidas a cada 24 horas para condições de temperatura diferentes e a cada 48 horas analisadas obtiveram a média de densidade em 1,0077 g/mL para o enxaguatório bucal e 1,216 g/mL para o dentifrício (Tabelas 11 e 12).

No teste de estabilidade acelerada os produtos, enxaguatório bucal e dentifrício apresentaram média de densidade em temperatura ambiente de 1,036 g/mL e 1,2158 g/mL, respectivamente. As amostras que foram pra estufa resultaram em média de densidade em 1,012 g/mL para o enxaguatório bucal e 1,2119 g/mL para o dentifrício. Nas condições de temperatura da geladeira as médias de densidade obtidas foram 1,0047 g/mL para o enxaguatório bucal e 1,2192 g/mL para o dentifrício (Tabelas 13 e 14).

Tendo em vista que a densidade obtida logo após a formulação dos produtos foram 1,2172 g/mL para o enxaguatório e 1,2216 g/mL para o dentifrício foi possível concluir que nenhuma das duas formulações apresentaram variações significativas de densidade demonstrando que as formulações se mantiveram estáveis quando levado em consideração o parâmetro físico-químico da densidade.

Tabela 11 – Avaliação da densidade em estudo da estabilidade preliminar do enxaguatório bucal contendo extrato bruto seco das folhas de *E. uniflora* L.

Densidade das amostras – Enxaguatório Bucal (g/mL)							
	2° dia	**4° dia**	**6° dia**	**8° dia**	**10° dia**	**12° dia**	**Média**
Temperatura ambiente	1,0043	1,002	1,0102	1,0021	1,0097	1,0128	1,009
Geladeira / Estufa	1,0031	1,0025	1,0031	1,0143	1,0125	1,0109	1,0077
Geladeira / Estufa	1,0011	1,0063	1,0159	1,0037	0,9997	1,0168	1,0072

Tabela 12 – Avaliação da densidade em estudo da estabilidade preliminar do dentifrício contendo extrato bruto seco das folhas de *E. uniflora* L.

Densidade das amostras – Dentifrício (g/mL)							
	2° dia	**4° dia**	**6° dia**	**8° dia**	**10° dia**	**12° dia**	**Média**
Temperatura ambiente	1,2216	1,2205	1,219	1,2187	1,2174	1,2172	1,009
Geladeira / Estufa	1,2243	1,2159	1,2152	1,2146	1,2135	1,2138	1,216
Geladeira / Estufa	1,22	1,216	1,2151	1,2146	1,2124	1,2475	1,22

Tabela 13 – Avaliação da densidade em estudo da estabilidade acelerada do enxaguatório bucal contendo extrato bruto seco das folhas de *E. uniflora* L.

Densidade das amostras – Enxaguatório Bucal (g/mL)							
	Tempo 0 /24 horas	**7° dia**	**15° dia**	**30° dia**	**60° dia**	**90° dia**	**Média**
Temperatura ambiente	1,0128	1,0037	1,0043	1,0205	1,0202	1,0203	1,0136
Estufa	1,0109	1,0166	1,0042	1,0139	1,0135	1,0132	1,012
Geladeira	1,0168	1,004	0,9975	1,0033	1,0036	1,0032	1,0047

Tabela 14 - Avaliação da densidade em estudo da estabilidade acelerada do dentifrício contendo extrato bruto seco das folhas de *E. uniflora* L.

Densidade das amostras – Dentifrício (g/mL)							
	Tempo 0 /24 horas	**7° dia**	**15° dia**	**30° dia**	**60° dia**	**90° dia**	**Média**
Temperatura ambiente	1,2172	1,216	1,215	1,216	1,214	1,217	1,2158
Estufa	1,2475	1,205	1,203	1,206	1,208	1,202	1,2119
Geladeira	1,2138	1,2121	1,2122	1,2225	1,2326	1,2221	1,2192

A viscosidade das amostras do dentifrício foram avaliadas com o auxílio de um viscosímetro rotativo de Brookfield com 4 velocidades, onde todas as velocidades foram testadas (6, 12, 30 e 60 rpm) com o spindle n° 4, porém o dentifrício demonstrou uma viscosidade acima do limite do equipamento, impedindo a realização do teste. Isto ocorreu devido ao produto se tratar de um material não-newtoniano plástico, onde não existe relação entre a força e o cisalhamento, pois a deformação ocorre apenas no local aonde a força é exercida (Ansel, et al, 2007).

6 CONCLUSÃO

6 CONCLUSÃO

Diante dos resultados obtidos no presente estudo é possível concluir que:

1. O extrato bruto seco de *Eugenia uniflora* L. (pitanga) produziu uma significante atividade antimicrobiana *in vitro* sobre as linhagens de *Streptococcus sanguis, Staphylococcus aureus* e *Candida albicans,* microrganismos que compõem o biofilme oral. Esses resultados são muito promissores considerando que a inibição do crescimento provocada pelo EBS das folhas de *E. uniflora* L. é tão eficaz quanto a inibição produzida pelo produto de referência utilizado neste estudo, o gluconato de clorexidina. A vantagem é que a utilização do EBS do estudo em substituição a clorexidina significa a diminuição de custos, de reações adversas e efeitos colaterais, associada à possibilidade de maior adesão ao tratamento por ser um componente ativo de origem vegetal.

2. As formulações obtidas, dentifrício e enxaguatório bucal, apresentaram ótimos resultados nos testes de estabilidade preliminar e acelerada demonstrando compatibilidade entre as formulações e o extrato bruto seco das folhas de *Eugenia uniflora* L. (pitanga). O que sugere a possibilidade de submeter às formulações desenvolvidas neste trabalho a estudos de estabilidade de longa duração e estudos clínicos.

REFERÊNCIAS

AHMED, M.; AMIN, S.; ISLAM, M.; TAKAHASHI, M.; OKUYAMA, E.; HOSSAIN, C.F. Analgesic principle from *Abutilon indicum*. **Pharmazie**, v. 55, p. 314-316, 2000.

ALMEIDA, P. F.; FRANCA, M. P; SANTOS, S. P.; MOREIRA, R. S.; TUNES, U. R. Microbiota estreptocócica associada com a formação inicial da placa dental. **R. Ci. Med. Biol.**, v. 1, n. 1, p. 33-41, 2002.

ANON. National Policy on Traditional Medicine and Regulation of Herbal Medicines: **Report of a WHO global survey**. Geneva: WHO, 2005.

ANSEL, H.C.; POPOVICH, N.G.; ALLEN JR. L.V. **Formas farmacêuticas & sistema de liberação controlada**, Sào Paulo, Editora Premier, 2000, 568p.

ANSEL, H.C.; POPOVICH, N.G.; ALLEN JR, L.V. **Formas farmacêuticas e sistema de liberação de fármacos.** 8ª Ed.- Porto Alegre: Artemed, 2007, 776p.

AURICCHIO, M.T.; BUGNO, A;. BARROS, S.B.M.; BACCHI, E.M. Atividades antimicrobiana e antioxidante e toxicidade de *Eugenia uniflora.* **Latin American Journal of Pharmacy,** v. 26, n. 1, 2007.

BABY A. R. Desenvolvimento e avaliação da estabilidade de formulações cosméticas anticelulíticas contendo o extrato vegetal comercial de *Trichilia catigua* Adr. Juss (e) *Pthychopetalum olacoides* Benthan, padronizado em flavonóides totais. 2005. 159f. **Dissertação** (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2005.

BAHNA, P.; HANNA, H.A.; DVORAK, T.; VAPORCIYAN, A.; CHAMBERS, M.; RAAD, I. Antiseptic effect of a novel alcohol-free mouthwash: a convenient prophylactic alternative for high-risk patients. **Oral Oncol**. v. 43, p. 159-164, 2007.

BARNES, J.; ANDERSON, L. A.; PHILLIPSON, J. D. Fitoterápicos. 3ª ed., Porto Alegre: Artmed, 2012. 720 p.

BORBA, A.M.; MACEDO, M.; WALTER, L.R.F. Alternative dentistry with medicinal plants in Chapada dos Guimarães - Mato Grosso, Brazil. **South Braz Dent J.** v. 5, n.1, p. 43-49, 2008.

BRANDÃO, A.C.C. **Ensaios para laboratório de controle de qualidade e controle de produção de medicamentos**. Rio de Janeiro: INCQS, 2001.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional De Vigilância Sanitária (ANVISA). Resolução **– RDC nº 17 de 24/02/2000.** Diário Oficial da República Federativa do Brasil, Poder Executivo, Brasília, DF, 25 de fevereiro de 2000.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). Resolução – **RDC nº 134 de 13 de julho de 2001** – Diário Oficial da União, Brasília, DF, de 13 de julho de 2001.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância Sanitária (ANVISA). **Portaria nº 14 de 08 de outubro de 1981**– Brasília, DF, de 08 de outubro de 1981.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). **Portaria nº 16 de 06 de março de 1995** dispõe do Regulamento Técnico das Boas Práticas para a Fabricação de Medicamentos (BPFM) – Diário Oficial da União, Brasília, DF, 06 de março de 1995.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). Resolução – **RDC nº 17 de 16 de abril de 2010** – Diário Oficial da União, Brasília, DF, de 16 de abril de 2010.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). Resolução – **RDC nº 210 de 04 de agosto de 2003** – Diário Oficial da União, Brasília, DF, de 04 de agosto de 2003.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Guia para a realização de estudos de estabilidade.** RE nº. 1, de 29 de julho de 2005.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Consulta Pública n. 43, de 7 de julho de 2004. Determina a publicação do **"Guia para realização de estudos de estabilidade"** Diário Oficial da União, Brasília, DF, 7 de julho de 2004.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução Re nº 89, de 16 de março de 2004. Determina a publicação da **"Lista de registro simplificado de fitoterápicos"**. Diário Oficial da União, Brasília, DF, 16 de março de 2004.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução Re nº 90, de 16 de março de 2004. Determina a publicação da **"Guia para a realização de estudos**

de toxicidade pré-clínica de fitoterápicos". Diário Oficial da União, Brasília, DF, 16 de março de 2004.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução Re nº 91, de 16 de março de 2004. Determina a publicação da **"Guia para realização de alterações, inclusões, notificações e cancelamentos pós registro de fitoterápicos"**. Diário Oficial da União, Brasília, DF, 16 de março de 2004.

BREVOORT, P. The US botanical market – na overview. **Herbalgram**. v. 36, p. 49-57, 1996.

BREVOORT, P. The booming US botanical market. A new overview. **Herbalgram**. v. 44, p. 33-46, 1998.

CARRANZA JÚNIOR, F. A. **Glickman's Clinical Periodontology: in controle de placa**. 7ª ed., Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, p. 509-527, 1992.

CIRQUEIRA, R. T.; ALVES, M. J. Q. F. Efeitos hipotensivo e diurético dos extratos aquosos de pitanga (*Eugenia uniflora* L.) e jambolão (*Eugenia jambolana* Lam.) em ratos normotensos anestesiados. **Rev. Bras. Pl. Med.,** v. 7, n. 2, p. 86-91, 2005.

CHARLET, E. **Cosmética para farmacêuticos**. Zaragoza: Editora Acribia, 192 p., 1996.

CORDEIRO, C. H. G.; SACRAMENTO, L. V. S.; CORRÊA, M. A.; PIZZOLITTO, A. C.; BAUAB, T. M. Análise farmacognóstica e atividade antibacteriana de extratos vegetais empregados em formulação para higiene bucal. **Rev Bras Cien Farm,** v. 42, n. 3, p. 395-404, 2006.

CORRÊA, N. M.; CAMARGO JUNIOR, F. B.; IGNÁCIO, R. F.; LEONARDI, G. R. Avaliação do comportamento reológico de diferentes géis hidrofílicos. **Rev. Bras. Cienc. Farm**., v. 41, n.1, p. 73-78, 2005.

COSTA, C. T. C.; BEVILAQUIA, C. M. L.; MORAIS, S. M.; VIEIRA, L. S. Taninos e sua utilização em pequenos ruminantes. **Rev. Bras. Pl. Med.,** v. 10, n. 4, p. 108-116, 2008.

COSTERTON, J. W. et al. Biofilms, the customized microniche. **J. Bacterial.** v. 176, n.8, p. 2137-2142, 1994.

COSTERTON, J. W. et al. Microbial biofilms. **Annu. Rev. Microbiol.** v. 49, p. 711-745, 1995.

EVANS, L.S.; ALBURY, K. & JENNINGS, N. Relationships between anatomical characteristics and ozone sensitivity of leaves of several herbaceous dicotyledonous plant species at Great Smoky Mountains National Park. **Environ. Exp. Bot.,** v. 36, p. 413-420, 1996.

FARMACOPÉIA BRASILEIRA, 4ª edição, Parte I. V.4.2.3 e V.4.2.4. Ed. Atheneu, São Paulo, 1988.

FARMACOPÉIA BRASILEIRA, 4ª edição, Parte II. Fascículo 5. Monografia nº 245. Ed. Atheneu, São Paulo, 1988.

FEIJÓ, A. M.; LUND, R. G.; NASCENTE, P. S.; SERPA, R.; BUENO, M. E. N.; RIBEIRO, G. A.; FREITAG, R. A.; DEL PINO, F. A. B. Estudo do efeito antimicrobiano dos extratos etanólicos de *Mentha arvensis* L. (Laminaceae) sobre patógenos orais. Disponível em <http://www.ufpel.edu.br/cic/2006/arquivos/CS_01666.rtf> Acesso em 10 jul., 2009.

FILHO, G. L.; ROSSO, V. V de; MEIRELES, M. A. A.; ROSA, P. T. V.; OLIVEIRA, A. L.; MERCADANTE, A. Z.; CABRAL, F. A. Supercritical CO_2 extraction of carotenoids from pitanga fruits (*Eugenia uniflora* L.). **J. Supercrit. Fluids,** v. 46, p 33-39, 2008.

GENNARO, A. R. **Remington: A ciência e a prática da Farmácia.** Ed. 20. Editora Guanabara Koogan. 2004, p. 2208.

GUERRA, M.P. AND NODARI, R.O. Biodiversidade: aspectos biológicos, geográficos, legais e éticos. In: Simões CMO, Schenkel EP, Gosmann G, Mello JCP, Mentz LA e Petrovick PR (org). **Farmacognosia: da planta ao medicamento.** 5 th ed. ed Universidade UFRGS and ed. da UFSC, Porto Alegre/Florianópolis, p. 13-28, 2004.

GIL, E.S. **Controle físico-químico de qualidade de medicamentos.** 2ª Ed. São Paulo: Pharmabooks, 2007.

GROVER, J. K.; YADAV, S.; VATS, V. Medicinal plants of India with anti-diabetic potential. **J. Ethnopharmacol.**, v. 81, p. 81-100, 2002.

HANHAM, A.; ADDY, M. The effect of chewing sugar-free gum on plaque regrowth at smooth and occlusal surfaces. In: PEREZ, A. La biopelícula: una nueva visión de la placa dental. **Rev. Estomatol. Herediana**., v. 15, n.1, p. 82-85, 2005.

HEASMAN, P. A.; SEYMOUR, R. A. Pharmacological control off periodontal disease. I. Antiplaque agents. **J Dent.** v. 22, p. 323-335, 1994.

HONG, S.K.; ANESTIS, D.K.; BROWN, P.I.; RANKIN, G.O. Effect of glucoronidation substrates/inhibitors on N-(3,5-dichlorophenyl) succinimide nephrotoxicity in Fisher 344 rats. **Toxicology**, v. 132, p. 43-55, 1999.

HOU, C. C.; LIN. S. J.; CHENG, J. T.; HSU, F. L. Antidiabetic dimeric guianolides and a lignan glycosid from *Lactuca indica*. **J. Nad. Prod.,** v. 66, p. 625-629, 2003.

JOVITO, V.C.; ALMEIDA, L.F.D.; FERREIRA, D.A.H.; MOURA, D.; PAULO, M.Q.; PADILHA, W.W.N. Avaliação in vivo de Dentifrício Contendo Extrato da Eugenia uniflora L. (Pitanga) sobre Indicadores de Saúde Bucal. **Pesq Bras Odontoped Clin Integr**, João Pessoa, v. 9, n.1, p. 81-86, 2009.

KADE, I. J.; IBUKUN, E. O.; NOGUEIRA, C. W.; ROCHA, J. B. T. de. Sun-drying diminishes the antioxidative potentials of leaves of *Eugenia uniflora* against formation of thiobarbituric acid reactive substances induced in homogenates of rat brain and liver. **Exp. Toxicol. Pathol.**, v. 60, p. 365-371, 2008.

KANAZAWA, A.; PATIN, A.; GREENE, A. E. Efficient, highly, enantioselective synthesis of selina-1,3,7 (11)-trien-8-one, a major component of the essential oil of *Eugenia uniflora*. **J. Nat. Prod.**, v.63, p. 1292-1294, 2000.

KELECOM, A.; ROCHA, M. A.; MAJDALANI, E. C.; GONZALEZ, M. S.; MELLO, C. B. Novas atividades biológicas em antigos metabólitos: ácido oleanólico e eugenol de *Eugenia caryophyllata.* **Rev. Bras. Farmacogn.,** v. 12, p. 70-71, 2002.

KOLEMBRANDER, P. E. Oral microbial communities: biofilms, interactions and genetic systems. **Annu. Rev. Microbiol.**, v. 54, p. 413-437, 2000.

KRISHNASWAMY, K.; RAGHURAMULU, N. Bioactive phytochemicals with emphasis on dietary practices. **Indian J. Med. Res.**, v. 108, p. 167-181, 1998.

LACHMANN, L. LIEBERMAN H. A.; KANIG, J. L. **Teoria e prática na indústria farmacêutica.** Ed. Fundação Calouste Gulbenkian, Lisboa, 2001.
LAWRENCE, J.R.; ZHU, B.; KORBER, D.R. Community-Level Assessment of the Effects of the Broad-Spectrum Antimicrobial Chlorhexidine on the Outcome of River Microbial Biofilm Development. **Appl. Environ. Microb.,** v. 74, n.11, p. 3541–3550, 2008.

LEE, M-H.; CHIOU, J-F.; YEN, K-Y.; YANG, L-L. EBV DNA polymerase inhibition of tannins from *Eugenia uniflora*. **Cancer Lett.**, v. 154, p. 131-136, 2000.

LEE, M-H.; NISHIMOTO, S.; YANG, L-L.; YEN, K-Y.; HATANO, T.; YOSHIDA, T. and OKUDA T. Two macrocyclic hydrolysable tannin dimers from *Eugenia uniflora.* **Phytochemistry**, v. 44, n.7, p.1343-1349, 1997.

LI, W. L.; ZHENG, H. C.; BUKURU, J.; De KIMPE, N. Natural medicines used in the traditional chinese medical system therapy of diabetes mellitus. **J. Ethnopharmacol.,** v. 92, p. 1-21, 2004.

LIU J. Pharmacology of oleanolic acid and ursolic acid. **J. Ethnopharmacol.**, v. 49, p. 57-68, 1995.

MARCOTTE, H.; LAVOIE, M. C. Oral microbial ecology and the role of salivary imunoglobulin A. **Microbiol. Mol. Biol. Rev.**, v. 62, p.71-109, 1998.

MARINHO, V.C.; HIGGINS, J.P.; LOGAN, S.; SHEIHAM, A. Fluoride mouthrinses for preventing dental caries in children and adolescents. **CochraneDatabase Syst Rev** (3): Art. No.: CD002284.

MARLES, R. J.; FARNSWORTH, N. R. Antidiabetic plants ant their active constituents. Review. **Phytomedicine**, v. 2, p. 137-189, 1995.

MARSH, P. D. Microbial ecology of dental plaque and its significance in health and disease. **Adv. Dent. Res**. v.8, n. 2, p. 263-271,1994.

MARSH, P. D. Dental plaque as a microbial biofilm. **Caries Res.**, Vol. 38, pp. 204-211, 2004.

MELO, A. F. M. Estudo galênico de formas plásticas (gel e creme) do extrato bruto de *Anacardium occidentale* L. Recife/PE, 2002. 103 p. (**Dissertação de mestrado em Ciências Farmacêuticas).** Departamento de Ciências Farmacêuticas/Universidade Federal de Pernambuco. 2002.

MELO, A.F.M.; HIGINO, J.S.; ALBUQUERQUE, M.M.; SILVA, M.A.L.; BARROS, J.D.; CARVALHO, A.L.; LEITE, V.R.; DINIZ, M.F.F.M. Avaliação do estrato bruto de *Anacardium occidentale Linn* na biodistribuição. **Bio Farma** v. 1 n. 1, p. 40-43, 2006a.

MELO, E.A.; MACIEL, M.I.S.; LIMA, V.L.A.G.; LEAL, F.L.L.; CAETANO, A.C.S.; NASCIMENTO, R.J. Capacidade oxidante de hortaliças usualmente consumidas. **Ciênc. Tecnol. Aliment**. v.26, n.3 p.639-644, 2006.

MELO, A. F. M.; TORRES, V. M. **Plantas Medicinais – terapêutica e toxicologia.** Pitanga. Livro Rápido, p. 135-143, 2009.

MOLLER, C.; HANSEN, S.H.; CORNETT, C. Characterization of tannin-containing herbal drugs by HPLC. **Phytochem Anal**. v.20, n.3, p. 231-239, 2009.

NEGRI, G. Diabetes melito: plantas e princípios ativos naturais hipoglicemiantes. **Rev. Bras. Ciênc. Farm.,** v. 4, n 2, p. 121-142, 2005.

NEWBRUN, E. Cariology. 3rd ed. Chicago: **Quintessense**, 1989. 389 p.

NOIRI, Y., OKAMI, Y.; NARIMATSU, M.; TAKAHASHI, Y.; KAWAHARA, T.; EBISU, S. Effects of chlorhexidine, minocycline, and metronidazole on *Porphyromonas gingivalis* strain 381 in biofilms. **J Periodontol.** v. 74, p. 1647-1651, 2003.

OGUNWANDE, I. A.; OLAWORE, N. O.; EKUNDAYO, O.; WALKER, T. M.; SCHMIDT J. M.; SETZER, W. N. Studies on the essential oils composition, antibacterial and cytotoxocity of *Eugenia uniflora* L. **The international Journal of Aromatherapy**, v.15, p. 147-152, 2005.

OHKUBO, T.; SHIBATA, M. The selective capsaicin antagonistcapsazepine abolishes the antinociceptive action of eugenol and guaiacol. **J. Dent. Res.**, v. 76, p. 848-851, 1997.

OKUDA, T. Systematics and health effects of chemically distinct tannins in medicinal plants. **Phytochemistry**, v.66, p. 2012-2031, 2005.

OLIVEIRA, A. M.; HUMBERTO, M. M. S.; SILVA, J. M.; ROCHA, R. F. A.; SANT'ANA, A. E. G. Estudo fitoquímico e avaliação das atuvidades moluscicidas e larvicida dos extratos da casca do caule e folha de *Eugenia uniflora* L. (Myrtaceae). **Rev. Bras. Farmacogn.,** v. 16, p. 618-624, 2006.

PANZERI, H. Um dentifrício experimental contendo própolis; Avaliação física, microbiológica e clínica; **Revista da ABO Nacional**, v. 7, p. 26-30, 1983.

PEREIRA, N. A. Plants as hypoglycemic agents. **Ciência e Cultura,** v. 49, p. 354-7, 1997.
PEREZ, A. La Biopelícula: uma nueva visión de la placa dental. **Rev. Estomatol. Herediana,** v. 15, n.1, p. 82-85, 2005.

PINTO, T. J. A.; KANEKO, M. A.; OHARA, M. T. **Controle biológico de qualidade de produtos farmacêuticos, correlatos e cosméticos**. 2ª Ed. São Paulo: Atheneu Editora, 2003. 325p.

REMINGTON, **Farmácia**. 17ª ed. Buenos Aires, Editorial Medica Panamericana, 1992, v. I e II, p. 2723.

SAID, O.; KHALIL, K.; FULDER, S.; AZAIZEH, H. Etnopharmacological survey of medicinal herbs in Israel, the Golan Heights and the West Bank Region. **J. Ethnopharmacol**, v. 83, p. 251-265, 2002.

SANTOS, S. C.; RIBEIRO, J. P.; GUIMARÃES, D. O.; SILVA, M. O.; FERRI, P. H.; GARCIA, A. C. F.; PIRES, J. S.; CASTRO, A. C. M.; SILVA, M. R. R.; PAULA, J. R. Antifungal activity of *Eugenia uniflora* L. fractions against *Paracoccidioides brasiliensis* (Splendore) Almeida. **Rev. Bras. Pl. Med.,** v. 7, n. 1, p. 30-33, 2004.

SCANNAPIECO, F. A. Saliva-bacterium interaction in oral microbial ecology. **Crit. Rev. Oral Biol. Med.,** v. 5, p. 203-248, 1994.

SHAMI, N. J. I. E.; MOREIRA, E. A. M. Lycopene as an antioxidant agent. **Rev. Nutr.**, v.17, n. 2, p. 227-236, 2004.

SOARES, D.G.S.; OLIVEIRA, C.B.; LEAL, C.; DRUMOND, M.R.S.; PADILHA, W.W.N. Susceptibilidade *in vitro* de bactérias bucais a tinturas fitoterápicas. **Rev. Odonto Ciênc.** – Fac. Odonto/PUCRS, v. 21, n. 53, 2006.

STEFANI, C. M.; LIMA, A. F. M. Avaliação dos efeitos clínicos da aplicação de gel de clorexidina em pacientes sob tratamento ortodôntico. **SOBRAPE**, v. 5, n. 3, p. 300-305, 1996.

UENO, L. S. **O Efeito de um verniz com clorexidina e de um verniz com flúor na Redução de Streptococcus mutans e no Índice de placa bacteriana.** Araçatuba/ São Paulo. 2001. 150p. (Dissertação de Mestrado). Campus de Araçatuba/ Faculdade de Odontologia da Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho". 2001.

VELASCO-DE-PAOLA, M.V.R. Fatores que influenciam na estabilidade de produtos cosméticos. In: Congresso Brasileiro de Cosmetologia, 15º, 2001. São Paulo. **Anais do Congresso**. São Paulo: Associação Brasileira de cosmetologia, p. 205-206, 2001.

VICTORIA, F.N.; LENARDAO, E.J.; SAVEGNAGO, L.; PERIN, G.; JACOB, R.G.; ALVES, D.; SILVA, W.P.; MOTTA, A.S.; NASCENTE, P.S. Essential oil the leaves of

Eugenia uniflora L.: Antioxidant and antimicrobial properties. **Food Chem. Toxicol,** v. 50, p.2668-2674, 2012.

VOIGT, R. **Tratado de tecnologia farmacêutica**. Zaragora, Editorial Acribia, 1982, p. 769.

VOLPATO, G. T.; DAMASCENO, D.C.; CALDERON, I. M. P.; RUDGE, M. V. C. Revisão de plantas brasileiras com comprovado efeito hipoglicemiante no controle do Diabetes mellitus. **Rev. Bras. Pl. Med.,** v. 4, n. 2, p. 35-45, 2002.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. WHO **Guidelines for Developing Consumer Information on Proper Use of Traditional Medicines and Complementary/ Alternative Medicines**. Geneva, Switzerland: World Health Organization, 2004.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. WHO **Guidelines on Safety Monitoring of Herbal Medicines in Pharmacovigilance Systems.** Geneva, Switzerland: World Health Organization, 2004.

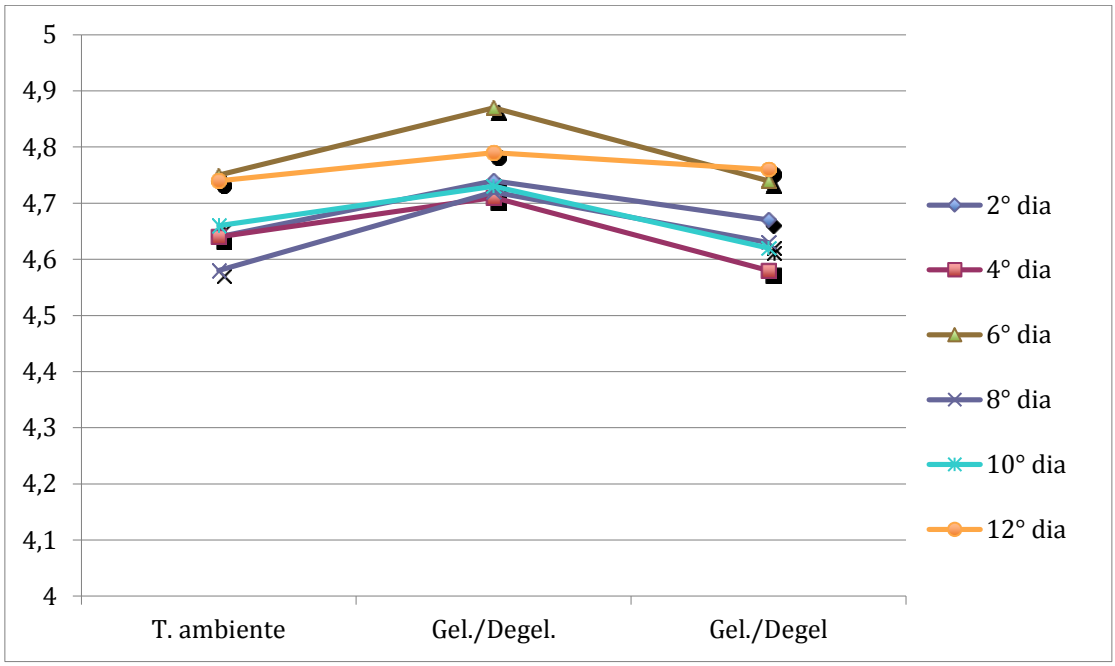
WORLD HEALTH ORGANIZATION. WHO **Guidelines on Good Agricultural and Collection Practices (GACP) for Medicinal Plants**. Geneva, Switzerland: World Health Organization, 2003.

WHO expert committee on specifications for pharmaceutical preparations. (**World Health Organizations**, Switz.). World Health Organization Technical Report Series, 908, i-viii, 1-136 (English) 2003.

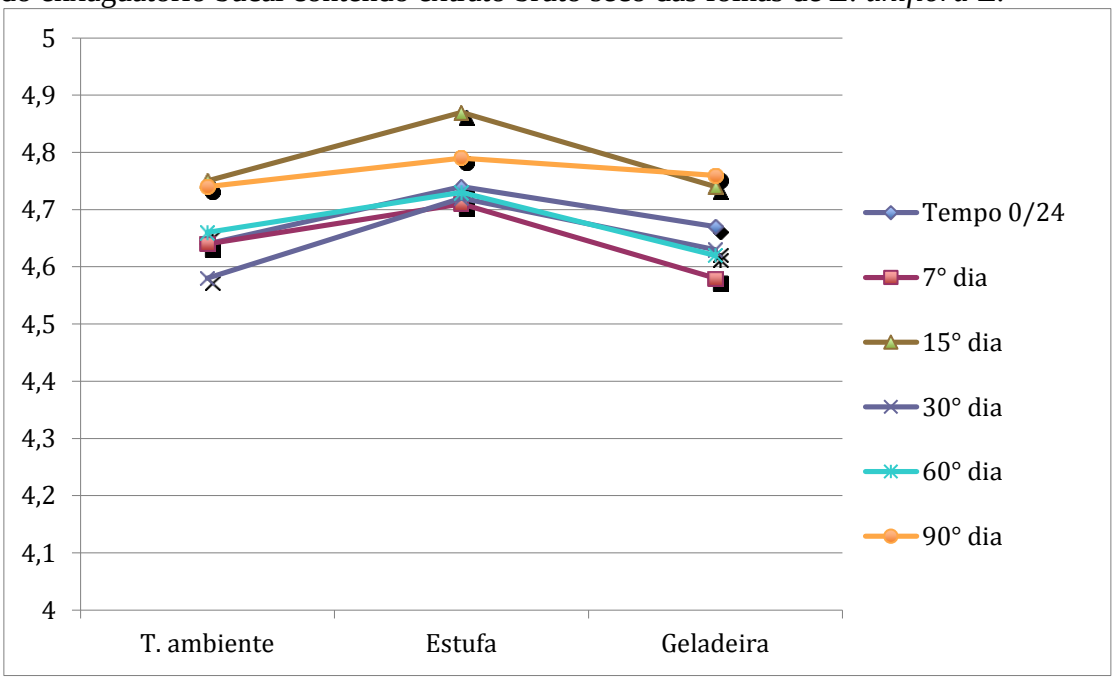
ZOBELL, C. E. The effect of solid surfaces upon bacterial activity. **J. Bacteriol.**, v. 46, p. 39-56, 1943.

ANEXOS

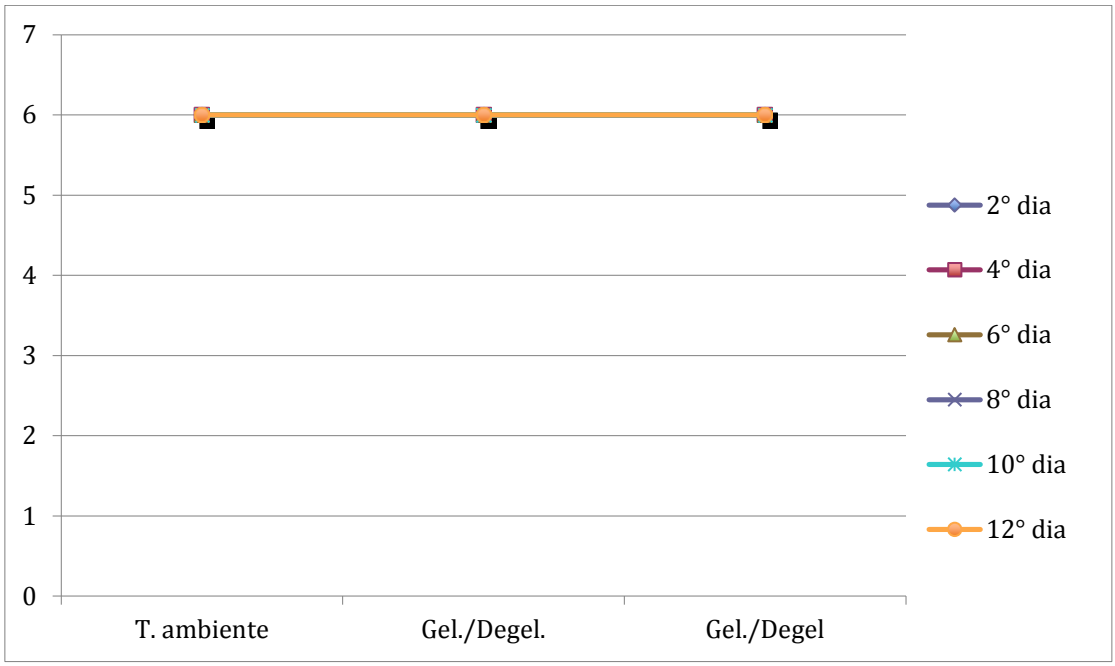
ANEXO A – Representação gráfica da avaliação do pH no estudo de estabilidade preliminar do enxaguatório bucal contendo extrato bruto seco das folhas de *E. uniflora* L.



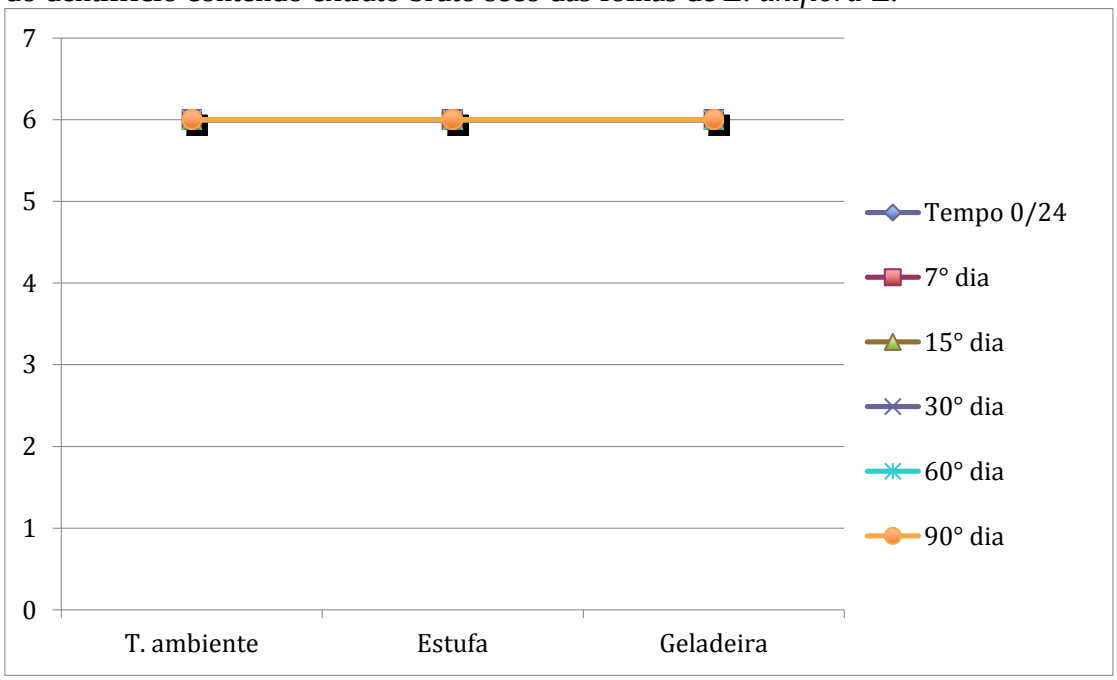
ANEXO B – Representação gráfica da avaliação do pH no estudo de estabilidade acelerada do enxaguatório bucal contendo extrato bruto seco das folhas de *E. uniflora* L.



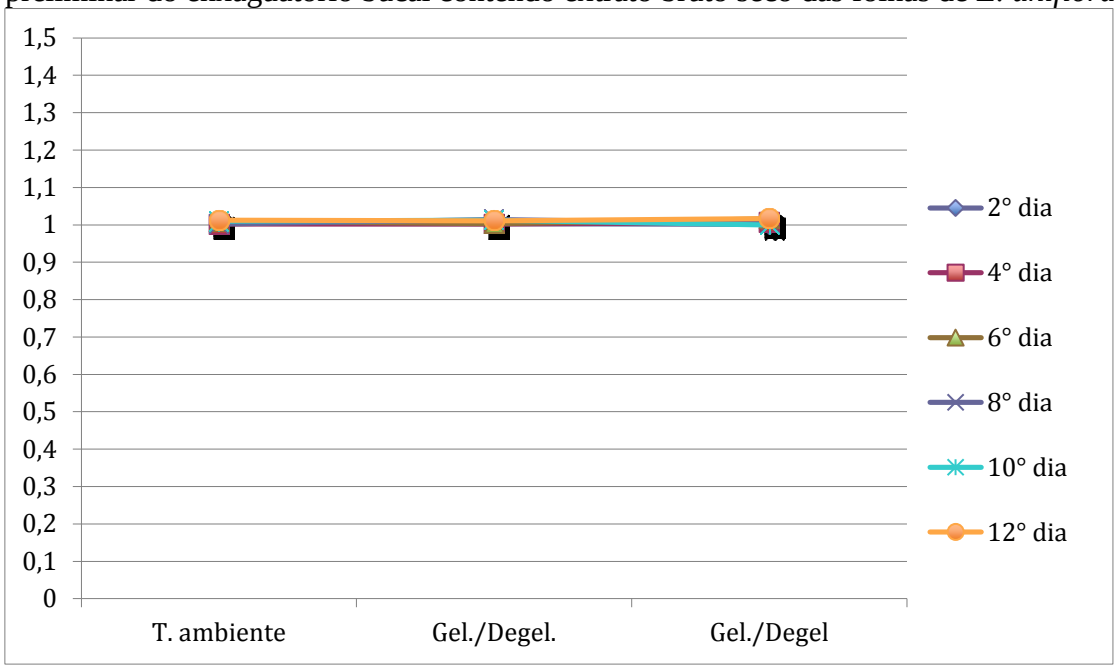
ANEXO C – Representação gráfica da avaliação do pH no estudo de estabilidade preliminar do dentifrício contendo extrato bruto seco das folhas de *E. uniflora* L.



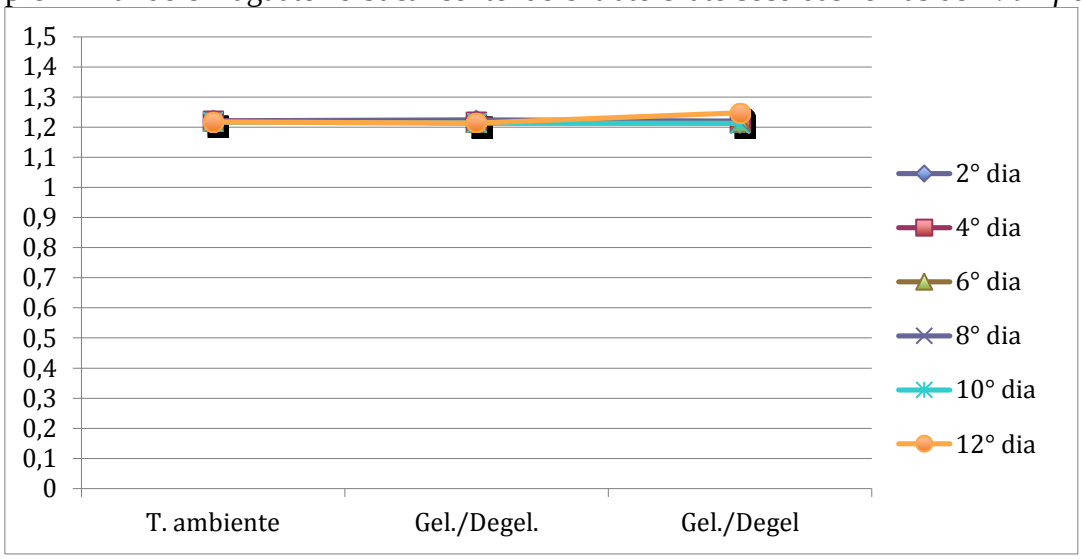
ANEXO D – Representação gráfica da avaliação do pH no estudo de estabilidade acelerada do dentifrício contendo extrato bruto seco das folhas de *E. uniflora* L.



ANEXO E – Representação gráfica da avaliação da densidade em estudo da estabilidade preliminar do enxaguatório bucal contendo extrato bruto seco das folhas de *E. uniflora* L.

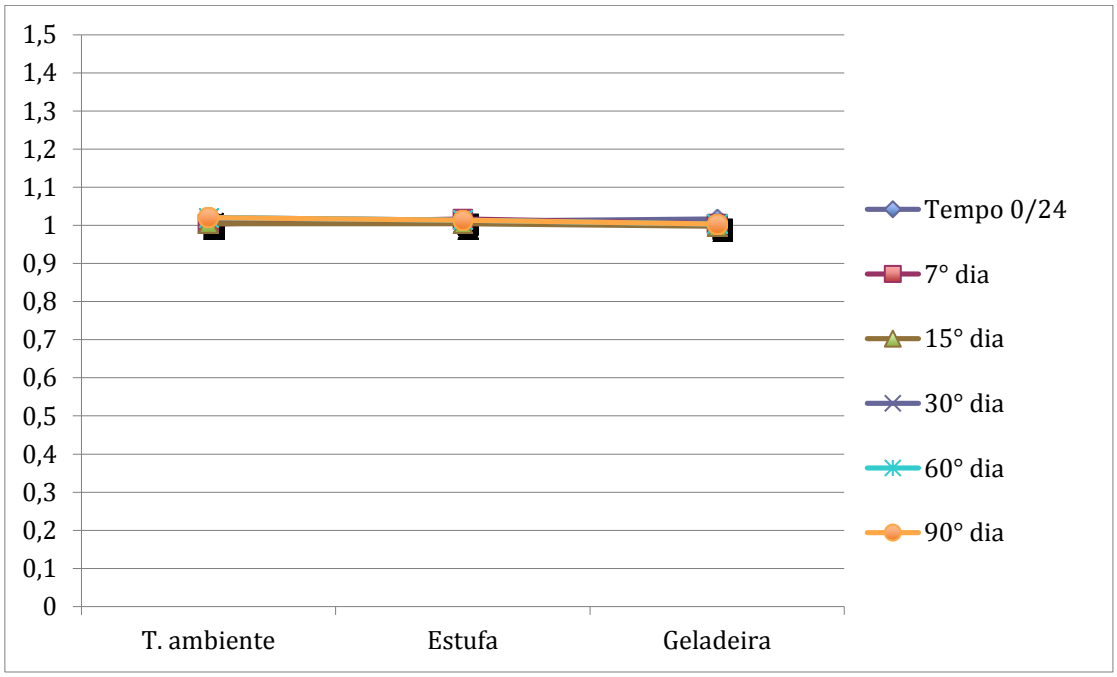


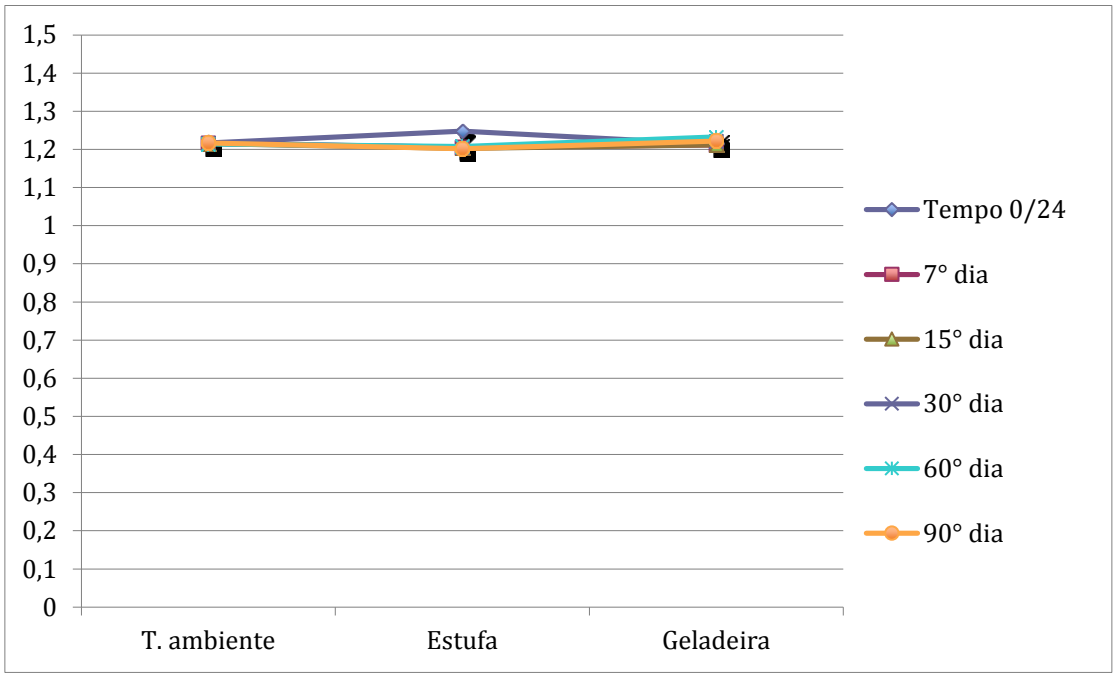
ANEXO F – Representação gráfica da avaliação da densidade em estudo da estabilidade preliminar do enxaguatório bucal contendo extrato bruto seco das folhas de *E. uniflora* L.



ANEXO G – Representação gráfica da avaliação da densidade em estudo da estabilidade acelerada do enxaguatório bucal contendo extrato bruto seco das folhas de *E. uniflora* L.

.



ANEXO H – Representação gráfica da avaliação da densidade em estudo da estabilidade acelerada do dentifrício contendo extrato bruto seco das folhas de *E. uniflora* L.

.